

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



INFECÇÃO PNEUMOCÓCICA INVASIVA NO IDOSO EM PORTUGAL EM 2008 E 2009

Jorge Miguel Diamantino Miranda

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



INFECÇÃO PNEUMOCÓCICA INVASIVA NO IDOSO EM PORTUGAL EM 2008 E 2009

Dissertação orientada por Prof. Dr. José Melo Cristino (IM-FMUL)
e Prof. Dra. Lélia Chambel (BioFIG-FCUL)

Jorge Miguel Diamantino Miranda

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2011



INFECÇÃO PNEUMOCÓCICA INVASIVA NO IDOSO EM PORTUGAL EM 2008 E 2009

Jorge Miguel Diamantino Miranda

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2011

Esta dissertação foi elaborada no Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, sob a orientação directa do Prof. Dr. José Melo Cristino.

A Prof. Dra. Lélia Chambel foi a orientadora interna designada no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor José Melo Cristino pela sua orientação nesta dissertação de mestrado e por ter permitido a realização deste trabalho no Instituto de Microbiologia.

Ao Professor Doutor Mário Ramirez agradeço a sua disponibilidade para esclarecer todas as dúvidas que surgiram e por me ter atribuído uma bolsa de investigação.

Agradeço à Professora Doutora Lélia Chambel por ter aceitado ser a minha orientadora interna na FCUL e pelas valiosas sugestões que foi fornecendo ao longo da elaboração desta dissertação de mestrado.

Agradeço à Sandra Aguiar por me ter ensinado as técnicas de serotipagem, PFGE e MLST e pela sua orientação e apoio no meu início na área dos pneumococos.

À Margarida Carrolo agradeço por me ter orientado na parte da determinação dos ferotipos e pelos momentos divertidos passados no laboratório M1.

Agradeço à Ana Friães por me ter orientado quando entrei no Instituto de Microbiologia e por me ter ensinado a realizar os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Ao Professor Doutor Francisco Pinto agradeço a preciosa ajuda no tratamento estatístico dos dados.

Agradeço à Sandra Matos e à Vânia Silva por terem realizado os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos das estirpes do ano 2009 e pela companhia desde o meu início no laboratório.

Agradeço à Andreia Horácio, Catarina Pato, Joana Pimento Lopes, Joana Martins Lopes e restante pessoal do Instituto de Microbiologia pela disponibilidade em ajudar sempre que foi preciso e pelo bom ambiente no laboratório.

Agradeço ao meu grupo de treino, em especial ao meu treinador Osvaldo Apolinário, pela amizade ao longo de uma década.

Por fim, agradeço o apoio da minha família, em especial da minha mãe e do meu pai, que sempre me ajudou a acreditar em mim e a ultrapassar as várias etapas da minha vida.

Resumo

As infecções pneumocócicas são responsáveis pela morte de 1,6 milhões de pessoas todos os anos. *Streptococcus pneumoniae* é responsável por cerca de metade dos casos de pneumonia adquirida na comunidade que é uma das principais causas de mortalidade nos idosos.

A vacina pneumocócica 23 valente (PPV23) é recomendada para indivíduos com idade ≥ 65 anos e está disponível em Portugal desde 1996. A vacina conjugada 7 valente (PCV7) foi introduzida na vacinação pediátrica em 2001 em Portugal e alterou a distribuição dos serotipos na população pneumocócica de crianças. Também houve um efeito de imunidade de grupo nos adultos devido à redução da transmissão dos serotipos incluídos na PCV7. Actualmente, estão licenciadas duas vacinas conjugadas para a vacinação pediátrica, uma com 10 serotipos (PCV10) e outra com 13 (PCV13). A utilização da PCV13 na vacinação de adultos foi aprovada recentemente.

O objectivo deste trabalho foi caracterizar a população responsável por infecções pneumocócicas invasivas em idosos (≥ 65 anos) em Portugal em 2008 e 2009 (n=399). Foi determinada a distribuição dos serotipos, a susceptibilidade aos antimicrobianos e a distribuição dos ferotipos. Os principais clones em circulação foram identificados através das técnicas de gel em electroforese de campo pulsado (PFGE) e *multilocus sequence typing* (MLST).

Os serotipos mais prevalentes foram 3 (14,5%), 7F (12,8%), 19A (12,0%), 14 (10,0%) e 1 (5,8%). O efeito de imunidade de grupo nos idosos devido à utilização da PCV7 nas crianças continuou a ocorrer pois houve uma diminuição dos serotipos incluídos nesta vacina entre o período pré-vacinal (1999-2003) e 2008-2009. Houve um aumento da resistência aos β -lactâmicos e aos macrólidos relativamente ao período pré-vacinal. O ferotipo CSP-1 foi predominante e esta característica é uma propriedade clonal. Os serotipos incluídos na PCV13 representaram 67,9% da população, portanto, a implementação desta vacina nos adultos poderá ter um impacto benéfico importante.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*, idoso, vacinas pneumocócicas, resistência a antimicrobianos, epidemiologia molecular.

Abstract

Annually 1.6 million deaths occur due to pneumococcal infections. *Streptococcus pneumoniae* is responsible for about half of community acquired pneumonia cases which is one of the main causes of mortality in the elderly.

The 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPV23) is recommended for individuals aged ≥ 65 years old and is available in Portugal since 1996. The 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) was licensed for pediatric use in 2001 in Portugal and changed the serotype distribution of the pneumococcal population causing invasive infections in children. It was also seen a herd immunity effect in adults due to the reduction of PCV7 serotypes transmission. There are currently two conjugate vaccines licensed for pediatric use, one with 10 serotypes (PCV10) and the other with 13 (PCV13). PCV13 was also recently approved for use in adults.

The aim of this study was to characterize the population responsible for pneumococcal invasive infections in elderly (≥ 65 years old) in Portugal in 2008 and 2009 (n=399). The serotype distribution, antimicrobial resistance and pherotype distribution was ascertained. The main clones in circulation were identified through pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST).

The most prevalent serotypes were 3 (14,5%), 7F (12,8%), 19A (12,0%), 14 (10,0%) and 1 (5,8%). The herd immunity effect due to vaccination of children with PCV7 continued to occur since there was a decrease in PCV7 serotypes between the pre-vaccination period (1999-2003) and 2008-2009. There was also an increase of resistance to β -lactams and macrolides when comparing with the pre-vaccination period. The dominant pherotype was CSP-1 and this characteristic is a clonal property. The PCV13 serotypes represented 67,9% of the population. So the implementation of PCV13 in adult vaccination may have an important beneficial impact.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, elderly, pneumococcal vaccines, antimicrobial resistance, molecular epidemiology.

Abreviaturas

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CC	Complexo clonal
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CSP	Péptido estimulador da competência (<i>Competence stimulating peptide</i>)
DLV	<i>Double locus variant</i>
DOC	Desoxicolato de sódio
FDR	Taxa de descoberta de falsos-positivos (<i>False discovery rate</i>)
I.C. 95%	Intervalo de confiança de 95%
LCR	Líquido cefalorraquidiano
M (fenotipo)	Resistência aos macrólidos
MLS _B (fenotipo)	Resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NT	Não tipável
OR	<i>Odds ratio</i>
pb	Par de bases
PBP	Proteína de ligação à penicilina (<i>Penicillin-binding protein</i>)
PCV7	Vacina pneumocócica conjugada 7 valente (<i>7-valent pneumococcal conjugate vaccine</i>)
PCV10	Vacina pneumocócica conjugada 10 valente (<i>10-valent pneumococcal conjugate vaccine</i>)
PCV13	Vacina pneumocócica conjugada 13 valente (<i>13-valent pneumococcal conjugate vaccine</i>)
PFGE	Gel em electroforese de campo pulsado (<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>)
PMEN	<i>Pneumococcal Molecular Epidemiology Network</i>
PPV23	Vacina pneumocócica polissacárida 23 valente (<i>23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine</i>)
SID	Índice de diversidade de Simpson (<i>Simpson's index of diversity</i>)
SLV	<i>Single locus variant</i>
ST	<i>Sequence type</i>
TD	Timo-dependente
TI	Timo-independente
TLV	<i>Triple locus variant</i>

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Abreviaturas	iv
Índice	v
Índice de Quadros	vii
Índice de Figuras	viii
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> e infecções pneumocócicas.....	1
1.2. Vacinas pneumocócicas	2
1.2.1 – Vacina polissacarídica	3
1.2.2 – Vacinas conjugadas	3
1.3. Resistência a antimicrobianos	4
1.4. Competência	5
1.5. Tipagem genotípica.....	6
1.5.1 – Gel em electroforese de campo pulsado (PFGE)	7
1.5.2 - <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	7
Objectivos	9
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	10
2.1. Colecção de estirpes	10
2.2. Identificação das estirpes	10
2.3. Caracterização fenotípica	12
2.3.1. Serotipagem	12
2.3.2. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos.....	13
2.4. Caracterização genotípica.....	14
2.4.1. Gel em electroforese de campo pulsado (PFGE)	14
2.4.2. <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	16
2.5. Determinação dos ferotipos	18

2.6. Análise estatística	19
Capítulo 3 – Resultados.....	20
3.1. Caracterização da colecção de estirpes.....	20
3.2. Caracterização fenotípica	20
3.2.1. Distribuição dos serotipos.....	20
3.2.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos	22
3.2.2.1. Fenotipos de resistência aos macrólidos	23
3.2.2.2. Relação entre o serotipo e a susceptibilidade aos antimicrobianos.....	23
3.3. Representação dos serotipos incluídos nas vacinas pneumocócicas.....	25
3.4. Distribuição dos ferotipos e a sua associação com o serotipo e a susceptibilidade aos antimicrobianos	26
3.5. Caracterização genotípica.....	27
3.5.1. <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)	27
3.5.2. Análise por serotipo dos perfis obtidos por PFGE	29
3.6. Congruência entre os métodos de tipagem	34
Capítulo 4 – Discussão dos Resultados	36
4.1. Distribuição dos serotipos	36
4.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos	38
4.3. Potenciais efeitos das vacinas conjugadas e da implementação da PCV13 na vacinação de adultos	40
4.4. Composição clonal	41
4.5. Distribuição dos ferotipos.....	42
4.6. Limitações	43
4.7. Perspectivas futuras	43
Capítulo 5 – Conclusões	45
Bibliografia.....	46

Índice de Quadros

Quadro 1 – Composição das vacinas pneumocócicas.....	2
Quadro 2 – Antimicrobianos testados neste trabalho.....	5
Quadro 3 – Sistema em xadrez utilizado para a serotipagem de <i>S. pneumoniae</i>	12
Quadro 4 – Oligonucleótidos iniciadores utilizados na técnica de MLST.	17
Quadro 5 – Oligonucleótidos iniciadores utilizados para a determinação dos ferotipos.....	19
Quadro 6 – Frequência de estirpes resistentes aos antimicrobianos estudados.	22
Quadro 7 – Relação dos serotipos com a resistência aos antimicrobianos.....	24
Quadro 8 – Associações significativas entre serotipo e ferotipo.....	26
Quadro 9 – Associação entre resistência aos antimicrobianos e ferotipo.	27
Quadro 10 – Complexos clonais e respectivos STs de cada serotipo.	28
Quadro 11 – Congruência entre os métodos de tipagem pelos coeficientes de Wallace e respectivos I.C. 95%.	35

Índice de Figuras

Figura 1 – Distribuição sazonal das infecções pneumocócicas em idosos.....	20
Figura 2 – Prevalência dos serotipos durante os anos 2008 e 2009.	21
Figura 3 – Serotipos associados aos fenotipos de resistência aos macrólidos.	23
Figura 4 – Frequência e susceptibilidade aos antimicrobianos dos serotipos incluídos nas vacinas pneumocócicas.....	25
Figura 5 – Perfis de bandas de DNA obtidos por PFGE.	29
Figura 6 – Dendrogramas dos perfis obtidos por PFGE dos serotipos 1, 22F, 3, 7F, 6C, 15A, 14, 19A, 9V e 19F.	32

Capítulo 1 - Introdução

1.1. *Streptococcus pneumoniae* e infecções pneumocócicas

Streptococcus pneumoniae, também referido como pneumococo, apresenta-se como cocos lanceolados de Gram-positivo que podem estar aos pares ou em pequenas cadeias após crescimento em meio líquido. Este microrganismo pertence ao grupo Mitis dos estreptococos que inclui 12 espécies filogeneticamente relacionadas através da sequenciação do rRNA 16S⁴⁷. As outras espécies deste grupo são comensais do aparelho respiratório superior e designam-se vulgarmente estreptococos viridans.

S. pneumoniae produz uma cápsula composta por polissacáridos. A cápsula é um dos principais factores de virulência e, entre outras funções, desempenha um papel importante na evasão às células fagocíticas⁴⁶. A composição dos polissacáridos capsulares define o serotipo de cada estirpe* e, actualmente, são reconhecidos 94 tipos. Porém, algumas estirpes não produzem cápsula e são menos virulentas. Estas, juntamente com as estirpes que não reagem com os soros disponíveis, designam-se não tipáveis (NT).

S. pneumoniae é um colonizador assintomático da nasofaringe. A colonização está relacionada com a capacidade de formação de biofilmes⁵⁶, tendo este tipo de estruturas um papel essencial no processo. As crianças, principalmente as que frequentam infantários, são as mais frequentemente colonizadas e são consideradas o principal reservatório deste microrganismo⁶⁴. A colonização é considerada um pré-requisito para que haja infecção¹¹, mas a maior parte dos portadores não desenvolve infecções pneumocócicas. No entanto, estas infecções têm um elevado impacto na saúde pois são responsáveis pela morte de cerca de 1,6 milhões de pessoas todos os anos⁷⁵. Os principais grupos afectados são as crianças com menos de 2 anos, os indivíduos com mais de 65 anos e as pessoas que possuam alguma co-morbilidade¹¹, como imunodeficiência congénita ou adquirida através de infecção com VIH, asplenia funcional ou anatómica, doenças pulmonares, vasculares e hepáticas crónicas ou *diabetes mellitus*^{18,57}.

S. pneumoniae é responsável por até cerca de metade dos casos de pneumonia adquirida na comunidade³² e esta doença é uma das principais causas de mortalidade nos idosos⁶⁵. As infecções pneumocócicas são classificadas em invasivas e não invasivas. Uma infecção é considerada invasiva quando se isola uma estirpe de um local normalmente estéril, como o sangue ou o líquido cefalorraquidiano (LCR)⁷⁵. As infecções invasivas, que incluem meningite, bacteriémia e outras localizações focais se acompanhadas de bacteriémia, são habitualmente muito graves e

* Definição de estirpe: no presente trabalho a palavra estirpe é utilizada para referir cada microrganismo recolhido de um produto biológico.

potencialmente fatais. Algumas infecções não invasivas são menos graves e incluem otite média aguda, sinusite e pneumonia sem bacteriémia.

1.2. Vacinas pneumocócicas

Com o objectivo de prevenir as infecções pneumocócicas foram desenvolvidas vacinas que utilizam os polissacáridos capsulares como agentes imunogénicos. Estas vacinas só conferem protecção contra os serotipos incluídos na sua composição e, por razões técnicas, é impossível incluir todos os serotipos conhecidos numa única vacina.

A prevalência de cada serotipo nas estirpes de infecções invasivas é diferente e apenas um número restrito é responsável pela maioria destas infecções. A sua distribuição varia consoante o grupo etário e também há diferenças na sua prevalência relativamente à colonização. Assim, alguns serotipos parecem ter uma capacidade invasiva superior, enquanto outros estão mais relacionados com a colonização⁶³. A sua prevalência também varia ao longo do tempo e há diferenças na sua distribuição entre vários países³⁸. Por esta razão, é importante monitorizar as estirpes em circulação na população ao nível local. Actualmente, a vigilância epidemiológica das infecções invasivas permite avaliar o efeito das vacinas na distribuição dos serotipos nos diversos países e se são necessárias novas formulações das vacinas actuais.

Existem dois tipos de vacinas, as vacinas polissacarídicas e as vacinas conjugadas com uma proteína adjuvante. Actualmente, em Portugal, estão licenciados os dois tipos de vacinas, havendo uma vacina polissacarídica 23 valente (PPV23) e duas vacinas conjugadas, uma com 10 serotipos (PCV10) e outra com 13 (PCV13). Nenhuma delas está incluída no Plano Nacional de Vacinação. A PPV23 foi introduzida em Portugal em 1996, enquanto as vacinas PCV10 e PCV13 foram licenciadas pela *European Medicines Agency* em Março e em Dezembro de 2009, respectivamente², tendo sido introduzidas em Portugal na mesma data. A PCV13 substituiu a vacina conjugada 7 valente (PCV7) que já estava implementada na vacinação pediátrica em Portugal desde Junho de 2001³, aumentando a protecção da vacina para 13 serotipos. Os serotipos incluídos nas composições das vacinas (Quadro 1) foram escolhidos por representarem a maior parte dos casos de infecções invasivas nos EUA na altura em que estas foram implementadas, estando alguns associados à resistência a antimicrobianos.

Quadro 1 – Composição das vacinas pneumocócicas.

Vacinas										Serotipos incluídos																								
PCV7														4		6B						9V		14		18C		19F		23F				
PCV10 ^a										1					4		5	6B		7F					9V		14		18C		19F		23F	
PCV13 ^b										1	3		4		5	6A	6B		7F					9V		14		18C		19A	19F		23F	
PPV23 ^c										1	2	3	4		5	6B		7F	8	9N	9V	10A	11A	12F	14	15B	17F	18C	19A	19F	20	22F	23F	33F

^aA PCV10 tem todos os serotipos da PCV7 mais os serotipos 1, 5 e 7F.

^bA PCV13 tem todos os serotipos da PCV10 mais os serotipos 3, 6A e 19A.

^cA PPV23 tem todos os serotipos da PCV13, excepto o serotipo 6A, e ainda possui mais 11 serotipos.

1.2.1 – Vacina polissacarídica

A vacina PPV23 é composta por polissacáridos capsulares purificados que representam 23 serotipos. Esta vacina é recomendada para os indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos e para indivíduos com idade igual ou superior a 2 anos que apresentem um elevado risco de infecção pneumocócica^{18,57}. Os polissacáridos desta vacina induzem uma resposta imunitária timo-independente (TI) em que não são estimuladas células de memória. As crianças com menos de 2 anos não são capazes de desenvolver uma resposta TI funcional, pois o seu sistema imunitário ainda não está completamente desenvolvido. Deste modo, a PPV23 não é adequada para crianças com menos de 2 anos. Pensa-se que a duração da protecção desta vacina é de 5-10 anos, uma vez que neste período de tempo o título dos anticorpos específicos para os serotipos retorna aos níveis anteriores aos da vacinação⁷⁴. No entanto, a revacinação só é aconselhada em casos específicos devido à incerteza quanto ao benefício da administração de uma segunda dose¹⁸.

A eficácia da PPV23 tem sido um tema muito discutido. Por um lado existem estudos que comprovam que a vacina é eficaz, mas por outro há estudos que não detectam nenhum efeito da vacina. Recentemente, foram elaboradas duas meta-análises^{43,54} que reflectem a inconsistência dos resultados obtidos. Estes dois estudos apresentam conclusões opostas quanto à prevenção das infecções invasivas nos adultos. No entanto, a eficácia da PPV23 é considerada baixa nos idosos, nos indivíduos imunocomprometidos e, como já foi referido, nas crianças com menos de 2 anos⁷³. Estes grupos são precisamente os que estão em maior risco de contraírem infecções pneumocócicas. Apesar de não haver consenso sobre a eficácia da PPV23, esta vacina continua a ser recomendada pois não apresenta efeitos secundários significativos e, até há pouco tempo, foi a única disponível para adultos.

1.2.2 – Vacinas conjugadas

As vacinas conjugadas são compostas por polissacáridos ligados a uma proteína transportadora. Estas vacinas são recomendadas para crianças com menos de 2 anos e para as crianças até 6 anos que possuam uma condição médica que aumente o risco de infecção pneumocócica⁵⁷. O sistema imunitário das crianças com menos de 2 anos é capaz de montar uma resposta timo-dependente (TD) eficiente, portanto, como os polissacáridos conjugados com uma proteína induzem uma resposta TD, as vacinas conjugadas são eficazes neste grupo etário. Assim, após três doses no primeiro ano de vida, estas vacinas induzem a activação de células de memória e a sua protecção é prolongada. As vacinas conjugadas também conferem imunidade nas mucosas⁵⁸, impedindo a colonização da nasofaringe pelos serotipos vacinais⁴⁸.

A PCV7 foi a primeira vacina conjugada introduzida em Portugal e provocou uma alteração na distribuição dos serotipos tanto em colonização⁶⁴ como nas infecções invasivas^{2,3}. A representação dos serotipos vacinais responsáveis por infecções invasivas nas crianças diminuiu e, de uma forma menos

acentuada, também diminuiu nos adultos³. Assim, esta vacina revelou-se muito eficaz na prevenção das infecções pneumocócicas pelos serotipos vacinais e nos EUA verificou-se um declínio da incidência das infecções invasivas em todos os grupos etários⁵⁹. O efeito verificado nos adultos, que é um grupo não vacinado, foi devido, provavelmente, à interrupção da transmissão dos serotipos vacinais pelas crianças vacinadas. Este efeito protector exercido sobre os grupos não vacinados designa-se imunidade de grupo.

A diminuição da incidência dos serotipos incluídos na PCV7 teve como consequência a expansão de serotipos não incluídos que aumentaram a sua frequência nas infecções invasivas. Esta substituição foi devida ao impedimento da colonização da nasofaringe por serotipos vacinais que permitiu a expansão de serotipos não vacinais neste nicho ecológico²⁷. O serotipo 19A foi um dos serotipos não vacinais que apresentou uma maior expansão, tanto nos EUA⁵⁹ como na Europa^{6,53}. Este serotipo também aumentou em zonas onde a PCV7 não estava implementada, portanto, a PCV7 apenas reforçou ou acelerou a expansão do serotipo 19A¹. Os genotipos que apresentem serotipos incluídos na vacina também podem escapar à pressão vacinal pela alteração da sua cápsula através da recombinação genética dos seus genes capsulares. Foi documentado nos EUA que um genotipo associado ao serotipo 4 obteve os genes capsulares do serotipo 19A, escapando à PCV7¹². A PCV7 inclui serotipos associados à resistência a antimicrobianos e, logo após a sua introdução, a frequência de estirpes resistentes diminuiu. Porém, a resistência a antibióticos aumentou novamente, pois alguns dos serotipos não vacinais que se expandiram estão associados à resistência, como é o caso do serotipo 19A²⁶.

A utilização da PCV13 na vacinação de adultos com idade igual ou superior a 50 anos foi autorizada, recentemente, pela *European Medicines Agency*. Foi comprovado que a PCV13 é mais imunogénica que a PPV23 para a maioria dos serotipos partilhados pelas duas vacinas e que é bem tolerada em adultos saudáveis⁶⁶. Actualmente, na Holanda, ainda está a decorrer um estudo em indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos para avaliar a eficácia da PCV13 em prevenir a pneumonia adquirida na comunidade³⁵. O uso desta vacina nos adultos pode ter a vantagem de conferir uma protecção eficaz contra os serotipos vacinais.

1.3. Resistência a antimicrobianos

A penicilina foi dos primeiros antibióticos a ser utilizado na terapêutica das infecções pneumocócicas e, actualmente, continua a ser muito importante. No entanto, devido à pressão selectiva imposta pelos antimicrobianos, começaram a aparecer globalmente estirpes resistentes não só à penicilina mas também a outros antibióticos.

No Quadro 2 apresentam-se os antimicrobianos testados neste trabalho e as classes a que pertencem. Estirpes resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos são consideradas multi-

resistentes⁵. Os β -lactâmicos, nomeadamente as penicilinas e as cefalosporinas, e os macrólidos são duas classes de antimicrobianos muito importantes no tratamento das infecções pneumocócicas.

Os β -lactâmicos actuam sobre as proteínas de ligação à penicilina (PBPs) e impedem a síntese do peptidoglicano. O mecanismo de resistência a estes antimicrobianos em *S. pneumoniae* deve-se à diminuição da afinidade de ligação às PBPs e não à produção de β -lactamases⁵. A afinidade de ligação às PBPs diminui por alterações nos genes que codificam estas proteínas, por mutações pontuais ou por recombinação genética. Estes genes também foram encontrados nos estreptococos viridans, o que sugere que a troca genética entre estas espécies foi importante no desenvolvimento da resistência¹⁹.

Os macrólidos são inibidores da síntese proteica e a resistência a esta classe de antimicrobianos pode ocorrer por dois mecanismos diferentes⁵. A alteração do alvo, que impede a ligação dos macrólidos à subunidade 23S do rRNA, torna as estirpes resistentes também a lincosamidas e a estreptograminas B e define o fenotipo MLS_B. O outro mecanismo resulta de uma bomba de efluxo que excreta o antimicrobiano do interior das células. A resistência, neste caso, é mais reduzida que a alteração do alvo e confere resistência apenas aos macrólidos, definindo o fenotipo M.

Além da resistência aos β -lactâmicos e aos macrólidos, também há estirpes resistentes à tetraciclina, ao sulfametoxazol-trimetoprim (também designado co-trimoxazol) e às fluoroquinolonas⁵. Ainda não foram detectadas estirpes resistentes à vancomicina e ao linezolid.

Quadro 2 – Antimicrobianos testados neste trabalho.

Antimicrobiano	Classe
Penicilina	β -lactâmicos (Penicilinas)
Amoxicilina	β -lactâmicos (Penicilinas)
Cefotaxima	β -lactâmicos (Cefalosporinas)
Eritromicina	Macrólidos
Clindamicina	Lincosamidas
Tetraciclina	Tetraciclinas
Co-trimoxazol	Sulfonamidas
Levofloxacina	Fluoroquinolonas
Cloranfenicol	Cloranfenicol
Telitromicina	Cetólidos
Linezolid	Oxazolidinonas
Vancomicina	Glicopéptidos

1.4. Competência

A transferência horizontal de genes tem um papel fundamental na evolução de *S. pneumoniae*. Esta troca genética é feita através da transformação, que é um processo de aquisição de DNA exógeno e da integração deste no genoma por recombinação sem recurso a um veículo específico. A competência é o estado fisiológico em que as células são capazes de realizar este processo. *S. pneumoniae* é naturalmente competente mas não é o único. Já foram descritas mais de 60 espécies que também desencadeiam este processo naturalmente⁴⁵. Em *S. pneumoniae* este mecanismo

permite, por exemplo, o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, a mudança da cápsula e a aquisição de factores de virulência^{25,36}. A competência ocorre durante a fase exponencial do crescimento e é um estado apenas temporário⁴⁹.

O mecanismo de regulação da competência é um sistema de *quorum-sensing* que monitoriza a concentração extracelular do péptido estimulador da competência (CSP) através de um sistema de dois componentes²¹. Este sistema é composto por uma histidina cinase, ComD, que é o receptor do CSP, e um regulador de resposta, ComE. Quando este sistema é activado por uma determinada concentração extracelular de CSP, é desencadeada uma cascata de reacções que tornam as células competentes. O CSP é um pequeno péptido constituído por 17 resíduos de aminoácidos e é codificado pelo gene *comC*⁴⁰. Foram identificados dois alelos deste gene que produzem dois péptidos funcionais capazes de induzir competência: CSP-1 e CSP-2^{61,62}. Cada estirpe possui apenas um dos alelos e também só responde à variante de CSP produzida. Esta especificidade resulta, provavelmente, da variabilidade existente no domínio de ligação ao CSP do receptor ComD³⁹. Assim, podem distinguir-se duas populações em *S. pneumoniae* consoante o tipo de CSP a que reagem, definindo dois ferotipos. A designação de ferotipo é dada porque o comportamento de CSP é semelhante ao de uma feromona.

Além da aquisição de DNA exógeno, durante a competência também é desencadeado um mecanismo em que estirpes de *S. pneumoniae* competentes induzem a lise de células não competentes da mesma espécie ou de espécies relacionadas²⁰. Este mecanismo foi denominado fratricídio porque permite a eliminação de células geneticamente semelhantes às células competentes. A libertação activa de DNA homólogo a partir deste processo aumenta a eficiência da transferência horizontal de genes⁴⁴ e a capacidade de formar biofilmes, uma vez que a concentração de DNA extracelular é um factor importante na formação destas estruturas¹⁶.

1.5. Tipagem genotípica

O serotipo é determinado por um número restrito de genes que podem ser transferidos por recombinação entre as estirpes de *S. pneumoniae*. Assim, um serotipo não representa necessariamente um clone* pois em cada serotipo podem existir estirpes com genotipos diferentes. Para distinguir estirpes fenotipicamente idênticas, utilizam-se dois métodos de tipagem genotípica: gel em electroforese de campo pulsado (PFGE) e *multilocus sequence typing* (MLST).

*Definição de clone: no presente trabalho um clone é definido pelo conjunto de estirpes que apresentam as mesmas características genotípicas pelos mesmos métodos de tipagem.

1.5.1 – Gel em electroforese de campo pulsado (PFGE)

PFGE é uma técnica que permite avaliar o grau de semelhança genética de estirpes bacterianas através da comparação de perfis de bandas de DNA cromossómico digerido com uma endonuclease de corte pouco frequente. Os fragmentos de DNA originados têm uma elevada dimensão, sendo necessário imobilizar o DNA em discos de agarose antes da digestão. Os fragmentos são separados electroforeticamente num gel de agarose em que a direcção da corrente eléctrica muda de forma sequencial, o que permite a sua distinção. A análise dos perfis obtidos é feita através da avaliação das diferenças quanto ao número de bandas e à dimensão dos fragmentos e permite construir um dendrograma que relaciona as estirpes pelo grau de semelhança calculado¹⁵. Os clones de PFGE são definidos utilizando como critério um determinado valor de semelhança.

Esta técnica é muito utilizada para estudar surtos infecciosos, uma vez que é capaz de distinguir estirpes que sejam muito próximas geneticamente. No entanto, a comparação de resultados entre laboratórios diferentes não é fácil e só é possível se existir um controlo rigoroso das condições experimentais.

1.5.2 - Multilocus Sequence Typing (MLST)

MLST é um método de tipagem que identifica as relações clonais entre estirpes através da comparação da sequência de nucleótidos de vários genes polimórficos conservados. Para cada gene é amplificado por PCR um fragmento interno com cerca de 450 pares de bases (pb) que é sequenciado posteriormente. Em *S. pneumoniae* são sequenciados sete genes: *aroE* (chiquimato desidrogenase), *ddl* (D-alanina-D-alanina ligase), *gdh* (glucose-6-fosfato desidrogenase), *gki* (glucose cinase), *recP* (transcetolase), *spi* (peptidase sinal I) e *xpt* (xantina fosforribosiltransferase)²⁹. Estes genes foram escolhidos por serem essenciais para o metabolismo de *S. pneumoniae* e, por isso, têm uma frequência de mutação baixa. A comparação de dados entre laboratórios é fácil porque as sequências de nucleótidos dos genes não são ambíguas e são facilmente transferidas por via electrónica²⁹. Existem vários alelos para cada gene atribuindo-se um número a cada um. Cada estirpe apresenta um conjunto específico de sete alelos que origina um perfil numérico. A cada perfil numérico é dado um número de *sequence type* (ST). As sequências dos alelos e os perfis numéricos dos STs estão depositados numa base de dados disponível na internet (<http://spneumoniae.mlst.net>) que é utilizada para comparar os dados.

Foi criada uma rede internacional de vigilância molecular de *S. pneumoniae* (*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network* – PMEN) cujo intuito inicial foi identificar clones resistentes com uma disseminação a nível internacional. Mais tarde, também foram incluídos clones susceptíveis com disseminação mundial. Esta rede definiu regras de nomenclatura dos clones PMEN em que o nome de cada clone é composto pelo país ou região onde foi descrito pela primeira vez, com o respectivo

serotipo em expoente, e pelo seu ST. Actualmente, esta rede reconhece 43 clones cujas características estão disponíveis em <http://www.sph.emory.edu/PMEN/>.

A relação genética entre as estirpes é avaliada pela comparação dos perfis numéricos. Estirpes com perfis numéricos iguais, ou seja, que têm o mesmo ST, são consideradas pertencentes ao mesmo clone e estirpes com apenas uma ou duas diferenças nos sete alelos são consideradas geneticamente relacionadas. O *software* PHYLOViZ foi criado para facilitar a comparação de dados de MLST. Este *software* utiliza o algoritmo goeBURST³¹ para agrupar os STs.

Algoritmo goeBURST

O algoritmo goeBURST (*global optimal eBURST*) resulta de uma melhoria do algoritmo eBURST³⁰ e baseia-se num modelo de evolução bacteriana simples. Este modelo assume que um determinado genotipo aumenta a sua frequência na população, tornando-se um clone fundador, e que esta expansão é acompanhada por uma diversificação gradual do genotipo por mutação ou recombinação³¹. Assim, a diversificação do clone fundador dá origem a genotipos com alelos diferentes cujo número aumenta ao longo do tempo, ou seja, primeiro surge um genotipo só com um alelo diferente (*single locus variant* – SLV), depois este genotipo também diversifica e, por sua vez, dá origem a outro com duas diferenças em relação ao clone fundador (*double locus variant*, DLV), depois com três (*triple locus variant*, TLV) e assim sucessivamente. O algoritmo goeBURST agrupa os STs em complexos clonais baseando-se no número de diferenças entre os perfis alélicos. Um complexo clonal (CC) é definido como um conjunto de STs derivados do mesmo genotipo. Dentro de cada CC, este algoritmo identifica o ST que mais provavelmente foi o genotipo fundador, que, por sua vez, dá o nome ao CC. Se for escolhido o nível de ligação SLV, este algoritmo estabelece ligações apenas entre STs que tenham uma diferença entre si. Assim, dentro de um complexo clonal cada ST está ligado a pelo menos um outro ST que seja seu SLV.

Objectivos

O objectivo deste trabalho foi caracterizar a população bacteriana responsável por infecções pneumocócicas invasivas em idosos (indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos) em Portugal em 2008 e 2009. A caracterização desta população consistiu na determinação da distribuição dos serotipos, na determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos, na identificação dos principais clones em circulação através das técnicas PFGE e MLST e na determinação da distribuição dos ferotipos, identificando o alelo do gene *comC* de cada estirpe. Com a avaliação da distribuição dos ferotipos tencionou saber-se se havia uma predominância de um dos ferotipos em relação ao outro e se havia associações com as outras características.

Através da comparação com estudos realizados anteriormente em Portugal, pretendeu avaliar-se o efeito que as vacinas disponíveis no período do estudo (PCV7 e PPV23) tiveram na estrutura da população pneumocócica. A distribuição dos serotipos e a susceptibilidade aos antimicrobianos foram comparadas entre o período anterior aos efeitos da vacina PCV7 e o período em estudo.

Este trabalho também teve como objectivo caracterizar a população pneumocócica antes da implementação da PCV13 na vacinação de adultos e avaliar o impacto que esta vacina poderá ter nos serotipos responsáveis por infecções invasivas nos idosos.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1. Colecção de estirpes

Desde 1999 que tem sido monitorizado pelo Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias as estirpes de *S. pneumoniae* responsáveis por infecções em Portugal. Esta vigilância é efectuada por mais de 30 laboratórios hospitalares situados em todas as regiões de Portugal, incluindo as Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira. Estes laboratórios recolhem estirpes a partir de doentes com infecções pneumocócicas que, posteriormente, são enviadas para o Instituto de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

A colecção estudada neste trabalho foi composta pelas estirpes que causaram infecções invasivas em pessoas idosas (≥ 65 anos) durante os anos 2008 e 2009 em Portugal. Estas estirpes foram recolhidas por 26 laboratórios hospitalares distribuídos por quase todas as regiões de Portugal, excepto os Açores [Zona Norte: Hospital de São Marcos, Braga (n=30); Centro Hospitalar do Alto Ave, Guimarães (n=25); Centro Hospitalar Póvoa de Varzim - Vila do Conde (n=5); Hospital Pedro Hispano, Matosinhos (n=21); Centro Hospitalar do Porto (n=19); Hospital de São João, Porto (n=32); Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia – Espinho (n=13); Centro Hospitalar de Entre o Douro e Vouga, Santa Maria da Feira (n=26); Zona Centro: Hospital Infante D. Pedro, Aveiro (n=7); Hospital de São Teotónio, Viseu (n=19); Centro Hospitalar de Coimbra (n=7); Hospitais da Universidade de Coimbra (n=8); Hospital de Santo André, Leiria (n=2); Zona Sul: Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca, Amadora (n=13); Centro Hospitalar de Cascais (n=10); Centro Hospitalar de Lisboa Norte (n=31); Centro Hospitalar de Lisboa Central (n=12); Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (n=17); Hospital dos S.A.M.S., Lisboa (n=4); Hospital Curry Cabral, Lisboa (n=4); Hospital Garcia de Orta, Almada (n=37); Hospital de Santa Luzia, Elvas (n=4); Hospital do Espírito Santo, Évora (n=7); Hospital José Joaquim Fernandes, Beja (n=2); Centro Hospitalar do Barlavento Algarvio, Portimão (n=29); Madeira: Hospital Central do Funchal (n=15)]. Apesar dos laboratórios terem sido contactados periodicamente, não foi feita nenhuma auditoria para averiguar se todas as estirpes recolhidas foram enviadas. Nos casos em que havia mais do que uma estirpe invasiva proveniente do mesmo doente só se incluiu uma no estudo, dando preferência às estirpes recolhidas a partir do LCR.

2.2. Identificação das estirpes

As estirpes, ao chegar ao Instituto de Microbiologia, foram inoculadas em placas de gelose sangue [*Tryptone Soya Agar* (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementado com 5% (v/v) de sangue de carneiro (Probiológica, Belas, Portugal)] e incubadas durante a noite a 35°C com uma atmosfera enriquecida com 5% de CO₂. A identificação laboratorial de *S. pneumoniae* consistiu na análise da

morfologia das colónias, do tipo de hemólise após crescimento em meio sólido enriquecido com sangue, da susceptibilidade à optoquina e, em casos duvidosos, da solubilidade em sais de biliar.

As colónias de *S. pneumoniae* são redondas, não pigmentadas e apresentam uma depressão central característica desta espécie que resulta de uma lise celular auto-induzida. Algumas estirpes têm um aspecto mucóide que é devido à maior produção da cápsula polissacarídica. Em meios contendo sangue, as colónias de *S. pneumoniae* são α -hemolíticas apresentando uma pigmentação verde em redor do crescimento devido à degradação parcial dos eritrócitos e consequente metabolização da hemoglobina. Porém, os estreptococos viridans também são α -hemolíticos, dificultando a sua distinção de *S. pneumoniae*. Laboratorialmente, esta distinção faz-se pelo teste de susceptibilidade à optoquina, em que os estreptococos viridans são resistentes e *S. pneumoniae* é sensível.

O teste de susceptibilidade à optoquina foi realizado através da colocação de um disco de papel de filtro com 5 μ g de optoquina (cloridrato de etilhidrocupreína) (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) na placa de gelose sangue de cada estirpe semeada aquando da sua chegada ao Instituto de Microbiologia. Os halos de inibição foram medidos após a incubação. As estirpes foram identificadas como sensíveis quando o seu halo era igual ou superior a 14 mm. As estirpes que apresentaram halos inferiores a 14 mm ou que nem sequer tinham halos de inibição foram submetidas ao teste de solubilidade em sais de biliar porque já foram descritas estirpes de *S. pneumoniae* resistentes à optoquina⁴. O teste de solubilidade em biliar foi feito pela suspensão das culturas bacterianas em 0,5 ml de 0,85% (p/v) de NaCl, com uma turbidez visualmente aproximada de McFarland 1, e pela adição de um volume igual de 2% (p/v) de desoxicolato de sódio (DOC), que é um sal presente na biliar, ou de 0,85% (p/v) de NaCl para o respectivo controlo. As estirpes foram incubadas a 35°C durante 15 min e a turbidez da suspensão com DOC foi comparada com a turbidez do controlo. As células de *S. pneumoniae* lisam na presença de sais biliares devido à activação das auto-lisinas, enquanto as células de outras espécies permanecem intactas. Assim, se a suspensão com DOC se apresentava límpida ou substancialmente menos turva que o controlo era indicativo de ser *S. pneumoniae*. No caso em que não havia diferença para a suspensão controlo, as suspensões voltaram a ser incubadas a 35°C até um máximo de 2 h. Se não ocorresse lise depois deste tempo de incubação, a estirpe não era considerada *S. pneumoniae*.

Após confirmação da espécie, as estirpes foram armazenadas a -70°C em meio *Tryptone Soya Broth* (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) com 15% (v/v) de glicerol. As estirpes para serem manuseadas foram sempre descongeladas e semeadas em placas de gelose sangue e incubadas durante a noite a 35°C com uma atmosfera enriquecida com 5% de CO₂.

2.3. Caracterização fenotípica

2.3.1. Serotipagem

O serotipo das estirpes foi determinado através do teste da reacção capsular (ou reacção de Quellung) em que os polissacáridos capsulares reagem com anticorpos específicos. Quando há reacção, observa-se aglutinação a olho nu, enquanto no microscópio óptico verifica-se que as bactérias estão agregadas e a cápsula torna-se visível porque o seu índice de refração é alterado com a imunoprecipitação⁷¹. Este teste foi realizado com um *kit* de soros (Statens Serum Institut, Copenhaga, Dinamarca) que se divide em *pools* (identificam vários serogrupos ou serotipos), soros de grupos (identificam um serogrupo), soros de tipos (identificam um serotipo) e soros de factores (identificam um serotipo dentro de um serogrupo). O teste de cada soro foi feito numa lâmina de microscopia pela mistura de cerca de 1 µl de soro com cerca de 3 µl de uma suspensão da estirpe em teste. A observação de aglutinação era sinal de uma reacção positiva. Devido ao elevado número de serotipos existentes, utilizou-se um sistema em xadrez⁷¹ (Quadro 3) para otimizar a serotipagem.

Quadro 3 – Sistema em xadrez utilizado para a serotipagem de *S. pneumoniae*.

Conjunto de <i>pools</i> existente	Serotipo ou serogrupo pertencentes ao conjunto de <i>pools</i> novo ^a					Serotipos ou serogrupos excluídos da vacina PPV23 ^a
	P	Q	R	S	T	
A	1	18*	4	5	2	
B	19*	6*	3	8		
C	7*				20	24*, 31, 40
D			9*		11*	16*, 36, 37
E			12*	10*	33*	21, 39
F				17*	22*	27, 32*, 41*
H	14	23*		15*		13, 28*
G ^b						29, 34, 35*, 42, 47*
I ^b						25*, 38, 43, 44, 45, 46, 48

^aOs serogrupos estão marcados com um asterisco e os serotipos ou serogrupos pertencentes à vacina PPV23 estão a negrito.

^bOs soros G e I, que se encontram sombreados, não reagem com nenhum serotipo da PPV23 e, por isso, não estão incluídos no sistema em xadrez.

Adaptado de Sorensen⁷¹.

Primeiro testaram-se sequencialmente os soros do conjunto de *pools* novo (soros P a T) que contêm todos os serotipos incluídos na vacina PPV23. Perante uma reacção positiva testaram-se os soros do conjunto de *pools* já existente (soros A-F e H) para determinar o serotipo ou serogrupo em comum com o soro que deu positivo. No caso de não ocorrer aglutinação com os soros de P a T, foram testados os soros que continham os serotipos ou serogrupos excluídos da vacina (soros C-I). O serotipo (ou serogrupo) identificado foi confirmado com o soro de tipo (ou de grupo) correspondente. Quando um serogrupo era encontrado, o serotipo foi determinado através dos soros de factores segundo uma tabela disponibilizada pelo Statens Serum Institut em <http://www.ssi.dk>. Houve uma estirpe que não

formava uma suspensão homogénea e que não aglutinava com o soro omni (soro que reage com todos os serotipos conhecidos). A sua solubilidade em bÍlis foi testada e confirmou-se que era *S. pneumoniae*. Assim, esta estirpe foi considerada NT.

2.3.2. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

A escolha dos antimicrobianos a testar foi feita com base na sua utilização clínica, na sua importância como marcadores de resistência e no facto de possibilitar a comparação com estudos anteriores. Assim, os perfis de susceptibilidade à penicilina, à amoxicilina em conjunto com ácido clavulânico e à cefotaxima foram determinados por Etest® (BioMérieux, Marcy l'Etoile, França) de acordo com as instruções do fabricante⁵². O ácido clavulânico foi utilizado porque no laboratório só estavam disponíveis tiras de Etest® de amoxicilina em conjunto com este inibidor de β -lactamases, mas a sua utilização não era necessária uma vez que *S. pneumoniae* não produz este tipo de enzimas. Os perfis de susceptibilidade à eritromicina, à clindamicina, à tetraciclina, à levofloxacina, ao cotrimoxazol, ao cloranfenicol, à telitromicina, ao linezolid e à vancomicina foram determinados através do método de Kirby-Bauer⁸ utilizando discos de difusão em agar (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), cada um com uma concentração definida, segundo as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)²³. A realização do teste aos antimicrobianos com discos de difusão apresenta algumas vantagens como a facilidade de execução da técnica, a reprodutibilidade dos resultados e o baixo custo dos reagentes necessários. Quanto às tiras Etest®, em comparação com os discos permitem, por um lado, uma leitura directa da concentração inibitória mínima (CIM) mas, por outro lado, têm um preço mais elevado. Estes dois métodos permitem classificar as estirpes como susceptíveis ou como resistentes, sendo que para alguns antimicrobianos a resistência pode dividir-se em dois níveis, intermédia e elevada. O antibiótico contido nos discos difunde-se radialmente pelo agar criando um gradiente de concentração em redor. As bactérias só se multiplicam a partir da concentração de antibiótico a que são resistentes. Assim, formam-se halos de inibição em redor dos discos cujos diâmetros são medidos. As tiras de Etest® apresentam um gradiente de concentração do antibiótico ao longo do seu comprimento que, ao difundir pelo agar, cria uma zona de inibição elíptica. A CIM é definida pelo valor lido na intercepção do crescimento bacteriano com a tira de Etest®. Em casos de dúvida entre dois valores, escolheu-se sempre o que apresentava a CIM mais elevada.

Para determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos escolhidos, prepararam-se suspensões das estirpes em 0,85% (p/v) de NaCl com uma turbidez visualmente semelhante a McFarland 0,5. Esta padronização do inóculo é importante para a reprodutibilidade dos resultados. Assim, com estas suspensões inocularam-se uniformemente placas de Mueller-Hinton (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementadas com 5% (v/v) de sangue de carneiro (Probiológica, Belas, Portugal) e foram colocados os discos e as tiras de Etest® dos antimicrobianos. As placas foram incubadas a 35°C com 5% de CO₂

durante 24 h. Após o tempo de incubação, mediram-se os halos de inibição em redor dos discos e leram-se os valores de CIM nas tiras Etest®. Para definir os níveis de susceptibilidade das estirpes, o diâmetro dos halos e os valores de CIM foram interpretados segundo as indicações do CLSI²². Em 2008 foi introduzida uma alteração nas normas do CLSI quanto à resistência à penicilina, em que os limites são diferentes para casos de meningite e de não meningite. Para facilitar a comparação com estudos epidemiológicos anteriores, utilizaram-se as indicações do CLSI de 2007²⁴ para definir os níveis de susceptibilidade à penicilina. Assim, valores de CIM de >0,06 até <2 µg/ml definiram resistência intermédia e valores ≥2 µg/ml definiram resistência elevada.

Para validar os resultados obtidos, a estirpe de referência *S. pneumoniae* ATTC 49619 foi utilizada como controlo, efectuando-se regularmente testes de susceptibilidade a esta estirpe com os antimicrobianos utilizados neste estudo. Os resultados foram validados comparando os valores obtidos com os intervalos de valores indicados nas normas do CLSI²².

2.4. Caracterização genotípica

2.4.1. Gel em electroforese de campo pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE divide-se em quatro passos: preparação dos discos de DNA, digestão dos discos com uma endonuclease de corte pouco frequente, electroforese de campo pulsado e análise dos perfis genómicos. O método utilizado para a preparação e digestão dos discos de DNA foi adaptado de Soares *et al.*⁷⁰

Preparação de discos de DNA

Após crescimento em gelose sangue, inocularam-se as estirpes em 5 ml de Bacto™ *Brain Heart Infusion* (BHI) (Becton Dickinson, Maryland, EUA). As estirpes foram incubadas em banho-maria a 37°C até atingirem uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) igual ou superior a 0,8, o que corresponde ao início da fase estacionária. As células foram centrifugadas a 4000 rpm (Eppendorf, modelo 5810R, rotor A-4-62, Nova Iorque, EUA) durante 15 min a 4°C. Lavaram-se as células com 1 ml de tampão PIV [0,01 M Tris (pH 7,5); 1 M NaCl] e centrifugaram-se novamente a 4°C durante 5 min à velocidade máxima, 16400 rpm (Eppendorf, modelo 5417R, rotor FA45-24-11, Nova Iorque, EUA). Suspenderam-se as células com 200 µl de PIV e mediu-se a concentração celular através da DO₆₂₀. Ajustou-se a concentração celular para obter uma densidade óptica aproximada de 5 (cerca de 7,5x10⁹ ufc/ml) adicionando o volume de PIV necessário. Para obter os discos, equilibraram-se 150 µl da suspensão celular a 41°C durante cerca de 30 s e adicionou-se um volume igual de 1,5% (p/v) de agarose *low melting point* (Bio-Rad, Califórnia, EUA) em tampão PIV, também equilibrada a 41°C. Após homogeneização, pipetaram-se alíquotas de 20 µl para uma placa de vidro e cobriram-se as gotas com lâminas de microscopia para formar discos. Os discos solidificaram a -20°C durante 5 min. Para lisar as

células e degradar o RNA, adicionou-se 1 ml do tampão de lise EC [Ribonuclease A 0,1 mg/ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha); 0,01 M Tris (pH 7,5); 1 M NaCl; 0,1 M EDTA (pH 8,0); 0,2% (p/v) de desoxicolato de sódio; 0,5% (p/v) de n-laurilsarcosina; 0,5% (p/v) de Brij 58 (polioxietileno 20 cetil éter)] e incubaram-se os discos durante 3 h a 37°C. Após este período de incubação, substituiu-se o tampão EC por 1 ml de tampão ESP [Proteinase K 1,5 mg/ml (Roche, Mannheim, Alemanha); 0,5 M EDTA (pH 9); 0,1% (p/v) de n-laurilsarcosina] e incubou-se a 50°C durante 17 h. Procedeu-se a três lavagens com 12 ml de tampão TE 1x [0,01 M Tris (pH 7,5); 1 mM EDTA (pH 8,0)], com agitação suave e pelo período de pelo menos 1 h. Os discos foram guardados a 4°C em tampão TE 1x até serem utilizados.

Digestão dos discos de DNA com uma endonuclease de corte pouco frequente

Para a digestão do DNA, utilizou-se uma endonuclease de corte pouco frequente, SmaI (10 U/μl) (Fermentas, Vilnius, Lituânia), que reconhece e corta a sequência 5'-CCC↓GGG-3'. Para as estirpes que apresentaram uma digestão incompleta devido a uma metilação no local de corte, foi utilizada a endonuclease Cfr9I (10 U/μl) (Fermentas, Vilnius, Lituânia) que reconhece a mesma sequência mas corta noutro local (5'-C↓CCGGG-3'). Assim, equilibraram-se os discos em 50 μl do tampão fornecido pelo fabricante para cada endonuclease à temperatura ótima de digestão (30°C e 37°C para SmaI e Cfr9I, respectivamente) durante 1 h. O tampão foi substituído por 45 μl de solução de digestão, que continha cerca de 7 unidades da endonuclease no respectivo tampão, e incubaram-se os discos à mesma temperatura durante a noite. Após a digestão, adicionaram-se 5 μl de solução corante 6x [0,25% (p/v) de azul de bromofenol e 0,25% (p/v) de xileno cianol FF em 40% (p/v) de sacarose]. Quando os discos não foram imediatamente utilizados, adicionaram-se 10 μl de tampão ES [0,5 M EDTA (pH 9); 0,1% (p/v) de n-laurilsarcosina] para parar a digestão e os discos foram armazenados a 4°C até à sua utilização.

Electroforese de campo pulsado

Para separar os fragmentos de DNA obtidos pela digestão com a endonuclease, colocaram-se os discos nos poços de um gel de 1% (p/v) de agarose (Bio-Rad, Califórnia, EUA) em tampão TBE 0,5x (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Os poços foram selados com a mesma agarose para evitar a saída dos discos durante a electroforese. Utilizaram-se discos de DNA do fago λ, *Lambda Ladder PFG Marker* (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), como marcadores de massa molecular. A electroforese foi realizada no aparelho CHEF-DRIII® (Bio-Rad, Califórnia, EUA) com tampão TBE 0,5x a uma temperatura de 14°C durante 23 h. A voltagem utilizada foi de 6,0 V/cm e o intervalo de variação dos pulsos inicial e final foi de 5 a 35 s. Após a electroforese, o gel foi corado com uma solução de 0,5 μg/ml de brometo de etídio durante a noite e fotografado com o sistema EDAS 290 (Eastman Kodak Company, Nova

lorque, EUA). Utilizou-se a estirpe R36A como controlo da digestão e separação dos fragmentos de DNA, uma vez que o seu perfil de PFGE é conhecido. A estirpe R36A é um mutante da estirpe clínica D39 (serotipo 2) que perdeu a capacidade de produzir cápsula, tornando-se avirulenta e mais segura de utilizar em laboratório⁴¹. Esta estirpe é utilizada internacionalmente como estirpe de referência.

Análise dos perfis genómicos

Os perfis de bandas obtidos foram analisados e comparados através do *software* BioNumerics® (versão 6.5, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica). Para agrupar e comparar as estirpes, foram construídos dendrogramas pelo método UPGMA (*unweighed pair group method with arithmetic means*) a partir dos valores de semelhança calculados pelo coeficiente de Dice. As definições de optimização e de tolerância utilizadas foram de 1,0 e 1,5%, respectivamente. Os clones de PFGE foram definidos pelo valor de semelhança $\geq 80\%$ nos dendrogramas. Este valor foi escolhido porque num estudo anterior¹⁵ agrupou a maioria das estirpes consideradas relacionadas através da inspecção visual do seu perfil.

2.4.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)

Os fragmentos internos de sete genes polimórficos conservados foram amplificados por PCR e foram sequenciados posteriormente. O elevado custo da sequenciação não permitiu aplicar esta técnica a todas as estirpes da colecção, optando-se por escolher aleatoriamente pelo menos metade das estirpes em cada serotipo encontrado. Quando o número de estirpes de um determinado serotipo era ímpar, o número escolhido foi sempre arredondado por excesso. Cada estirpe foi inoculada em BHI, incubando em banho-maria a 37°C até atingir uma DO_{600} de pelo menos 0,80. Para preparar o DNA, foram fervidos 9 µl de cultura em 441 µl de água durante 2 min, sendo, de seguida, colocados imediatamente em gelo durante 5 min. Para cada gene preparou-se a seguinte mistura de amplificação: 20 µl de DNA fervido; 0,02 U/µl de GoTaq® DNA polimerase (Promega, Wisconsin, EUA); tampão 1x apropriado para a enzima e fornecido pelo fabricante; 2 mM de cloreto de magnésio (Promega, Wisconsin, EUA); 0,2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) (Fermentas, Vilnius, Lituânia); 0,4 pmol/µl de cada oligonucleótido iniciador (up e dn) do gene a amplificar e 10,8 µl de água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Massachusetts, EUA), completando um volume final de 50 µl. As sequências dos oligonucleótidos iniciadores utilizados, bem como a dimensão do fragmento gerado de cada gene, encontram-se no Quadro 4.

Quadro 4 – Oligonucleótidos iniciadores utilizados na técnica de MLST.

Oligonucleótido iniciador ^a	Sequência (5'→ 3') ^b	Dimensão (pb) ^{c,d}	Dimensão do fragmento (pb) ^d
<i>aroE</i> _up	M13F – CGT TTA GCT GCA GTT GTT GC	38	405
<i>aroE</i> _dn	M13R-pUC – CCC ACA CTG GTG GCA TTA AC	38	
<i>ddl</i> _up	M13F – TTG CCA TGG ATA AAA TCA CGA C	40	441
<i>ddl</i> _dn	M13R-pUC – CGC GCT TGT CAA AAC TTT CC	38	
<i>gdh</i> _up	M13F – GTG CTG AAA AGA TTA AGG TCT	39	460
<i>gdh</i> _dn	M13R-pUC – TGC TTC CAG CTT TAT AGT CAT C	40	
<i>gki</i> _up	M13F – GGC ATT GGA ATG GGA TCA CC	38	483
<i>gki</i> _dn	M13R-pUC – TCT CCC GCA GCT GAC AC	35	
<i>recP</i> _up	M13F – GCC AAC TCA GGT CAT CCA GG	38	450
<i>recP</i> _dn	M13R-pUC – GCT TCC AAG TCT GTT CCA TTT TC	41	
<i>spi</i> _up	M13F – CGC TTA GAA AGG TAA GTT ATG	39	474
<i>spi</i> _dn	M13R-pUC – AGG CTG AGA TTG GTG ATT CTC	39	
<i>xpt</i> _up	M13F – GGA GGT CTT ATG AAA TTA TTA G	40	486
<i>xpt</i> _dn	M13R-pUC – AGA TCT GCC TCC TTA AAT AC	38	
M13F	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	18	
M13R-pUC	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	18	

^aOs iniciadores universais do fago M13 encontram-se sombreados.

^bTodos os genes up e dn possuem uma cauda M13F e M13R-pUC, respectivamente.

^cA dimensão dos iniciadores é a soma dos nucleótidos da cauda com os da sequência específica para o gene.

^dpb – par de bases.

Cada iniciador contém uma cauda antes da sequência específica para o gene. Esta cauda é um iniciador universal, neste caso do fago M13, que possibilita sequenciar vários genes numa só placa, permitindo uma optimização da sequenciação. Os fragmentos foram amplificados no termociclador MyCycler® (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Para amplificar todos os fragmentos, com excepção do gene *recP*, foi utilizado o seguinte programa: desnaturação a 95°C (5 min); 4 ciclos de desnaturação a 95°C (1 min), hibridação a 48°C (45 s) e alongamento a 72°C (1 min); 29 ciclos de desnaturação a 95°C (1 min), hibridação a 65°C (45 s) e alongamento a 72°C (1 min); terminação do alongamento a 72°C (5 min). Os iniciadores utilizados têm uma especificidade de ligação ao DNA menor devido à presença da cauda, por isso, a temperatura de hibridação inferior dos 4 ciclos iniciais permitiu que ocorresse uma hibridação com menor especificidade, facilitando o início da amplificação da sequência alvo. Os fragmentos do gene *recP* foram amplificados com o seguinte programa: desnaturação a 95°C (4 min); 30 ciclos de desnaturação a 95°C (30 s), hibridação a 58°C (30 s) e alongamento a 72°C (30 s); terminação do alongamento a 72°C (10 min). Os produtos de amplificação foram visualizados num gel de 1% (p/v) de agarose em tampão TBE 0,5x com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e purificados utilizando o kit comercial *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos de amplificação foram sequenciados pela empresa MacroGen Europe (Amesterdão, Holanda) utilizando o iniciador universal M13F (Quadro 4). Quando foram identificados novos alelos e sempre que havia dúvidas na inspecção

visual do cromatograma, os resultados foram confirmados através da sequenciação da outra cadeia com o iniciador universal M13R-pUC (Quadro 4).

As sequências obtidas foram analisadas através do BioNumerics®, onde se atribuiu um número de alelo a cada um dos genes e o respectivo ST (determinado pelo perfil alélico) através da comparação com a base de dados disponível em <http://spneumoniae.mlst.net/>. Os novos alelos e STs identificados foram submetidos ao curador da base de dados para atribuição de um novo número. A análise da relação genética entre os ST encontrados pela definição de complexos clonais foi feita através do *software* PHYLOViZ que utiliza o algoritmo goeBURST³¹. Para realizar o agrupamento das estirpes, utilizou-se a base de dados completa (todos os STs identificados actualmente). Este agrupamento em complexos clonais foi feito ao nível SLV, ou seja, todos os STs dentro de um complexo clonal estão ligados a pelo menos um SLV seu.

2.5. Determinação dos ferotipos

O ferotipo de cada estirpe foi determinado pela identificação do alelo do gene *comC*, como descrito anteriormente¹⁷. Para cada estirpe foi realizado um PCR múltiplo utilizando os oligonucleótidos iniciadores descritos no Quadro 5 que permitiram a amplificação de um fragmento com 620 pb, no caso do CSP-1, ou de um fragmento de 340 pb para o CSP-2. O iniciador CSP_up liga-se a uma região conservada entre os dois alelos do gene *comC*, enquanto os iniciadores CSP1_dn e CSP2_dn ligam-se a uma zona específica de cada um dos alelos. O DNA de cada estirpe foi preparado pelo mesmo método descrito na técnica de MLST. O PCR foi realizado com a seguinte mistura de amplificação: 20 µl de DNA fervido; 0,05 U/µl de GoTaq® DNA polimerase (Promega, Wisconsin, EUA); tampão 1x apropriado para a enzima e fornecido pelo fabricante; 2 mM de cloreto de magnésio (Promega, Wisconsin, EUA); 0,2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) (Fermentas, Vilnius, Lituânia); 0,4 pmol/µl de CSP_up; 0,4 pmol/µl de CSP1_dn; 0,8 pmol/µl de CSP2_dn e 10,5 µl de água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Massachusetts, EUA), completando um volume final de 50 µl. O PCR foi realizado no termociclador MyCycler® (Bio-Rad, Califórnia, EUA) com o seguinte programa de amplificação: desnaturação a 95°C (5 min); 30 ciclos de desnaturação a 95°C (1 min), hibridação a 55°C (30 s) e alongamento a 72°C (1 min); terminação do alongamento a 72°C (10 min). Os produtos de amplificação foram visualizados num gel de 1% (p/v) de agarose em tampão TBE 0,5x com 0,5 µg/ml de brometo de etídio. O marcador 1kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen, California, EUA) foi utilizado para avaliar a dimensão dos fragmentos amplificados que são facilmente distinguíveis por terem dimensões diferentes (620 bp e 340 bp para CSP-1 e CSP-2, respectivamente). Porém, algumas estirpes apresentavam os dois fragmentos. Na maior parte das vezes a quantidade amplificada de cada fragmento era diferente, o que sugeria que o ferotipo da estirpe era determinado pelo fragmento que apresentava maior intensidade. Nestes casos, o ferotipo foi determinado repetindo o PCR com um

aumento da temperatura de hibridação para 59°C. Em cada PCR foram utilizadas como controlo as estirpes R36A e TIGR4, cujos ferotipos são CSP-1 e CSP-2, respectivamente.

Quadro 5 – Oligonucleótidos iniciadores utilizados para a determinação dos ferotipos.

Oligonucleótido Iniciador	Sequência (5'→3')	Dimensão (pb) ^a	Dimensão do Fragmento (pb) ^a
CSP_up	TGA AAA ACA CAG TTA AAT TGG AAC	24	-
CSP1_dn	TCA AGA AAG GAT AAA GGT AGT CCT C	25	620
CSP2_dn	TAA AAA TCT TTC AAT CCC TAT TT	23	340

^apb – par de bases.

2.6. Análise estatística

O teste exacto de Fisher bilateral foi utilizado para avaliar a diferença de proporções entre dois períodos e para determinar associações entre características. Sempre que se efectuaram testes múltiplos, os valores-p obtidos pelo teste exacto de Fisher foram corrigidos controlando a taxa de descobertas de falsos positivos (FDR) pelo método linear de Benjamini e Hochberg¹⁰. Esta correcção foi aplicada porque a realização de um número elevado de testes múltiplos pode influenciar os resultados. Foram considerados significativos os valores-p menores que 0,05.

A associação dos ferotipos com o serotipo e a resistência aos antimicrobianos foi estimada por *odds ratios* (OR's) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (I.C. 95%) foram calculados pelo método de Fisher implementado na biblioteca Epitools do *software* R. A significância dos OR's foi avaliada pelo teste exacto de Fisher bilateral com correcção de FDR¹⁰.

Para analisar a diversidade da população segundo os diferentes métodos de tipagem foi utilizado o índice de diversidade de Simpson (SID). Este índice indica a probabilidade de duas estirpes retiradas aleatoriamente da população pertencerem a dois grupos diferentes¹⁴.

A congruência entre os métodos de tipagem utilizados foi obtida pelo cálculo dos coeficientes de Wallace^{14,60}. O coeficiente de Wallace representa a probabilidade de duas estirpes agrupadas por um determinado método de tipagem também o terem sido por outro método. Assim, o coeficiente de Wallace fornece informação num só sentido, ou seja, a probabilidade de duas estirpes do mesmo serotipo terem o mesmo ST pode ser diferente da probabilidade de duas estirpes com o mesmo ST terem o mesmo serotipo. Os I.C. 95% dos coeficientes de Wallace foram calculados pelo método de *jackknife*⁶⁸. Os índices de diversidade de Simpson e os coeficientes de Wallace foram calculados com uma ferramenta informática disponível em <http://www.comparingpartitions.info>.

Capítulo 3 – Resultados

3.1. Caracterização da colecção de estirpes

No total foram recolhidas 399 estirpes responsáveis por infecções pneumocócicas invasivas em indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos em Portugal durante os anos 2008 (n=185) e 2009 (n=214). Os doentes, a partir dos quais foi recolhida esta colecção de estirpes, tinham idade entre 65 e 99 anos e a idade média era de 78,5 anos.

Quanto à distribuição entre sexos, 56,4% eram do sexo masculino (n=225) e 43,6% do sexo feminino (n=174). A amostra biológica a partir da qual foi recolhida a maioria das estirpes foi o sangue (n=378, 94,7%), enquanto as restantes estirpes foram isoladas a partir de líquidos cefalorraquidianos (n=15) e líquidos pleurais (n=6), representando apenas 5,3% das amostras.

Durante os meses de Junho, Julho, Agosto e Setembro (período do Verão) foram recolhidas menos estirpes em comparação com os outros meses (Figura 1). O maior número de estirpes foi recolhido em Março. Esta diferença mensal na recolha de estirpes indica que existiu uma variação sazonal das infecções pneumocócicas em idosos, o que é típico deste tipo de infecções²⁸.

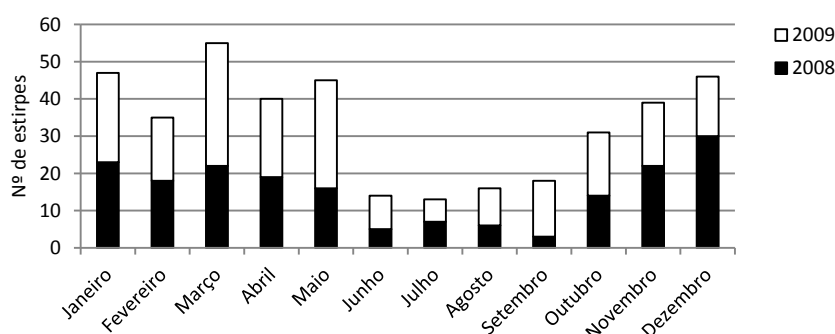


Figura 1 – Distribuição sazonal das infecções pneumocócicas em idosos.

3.2. Caracterização fenotípica

3.2.1. Distribuição dos serotipos

Na população estudada distingue-se 40 serotipos diferentes e uma estirpe NT, havendo 30 serotipos que se encontram em ambos os anos (Figura 2). O índice de diversidade de Simpson desta população relativamente ao serotipo é elevado (SID=0,929; I.C. 95%: 0,918-0,939), indicando que é muito diversificada. Quanto à prevalência, verifica-se que os serotipos 3 (n=58, 14,5%), 7F (n=51, 12,8%), 19A (n=48, 12,0%), 14 (n=40, 10,0%) e 1 (n=23, 5,8%) são os mais frequentes e representam 55% das estirpes recolhidas (Figura 2). Verificam-se algumas diferenças na frequência dos serotipos entre os dois anos, mas nenhuma é estatisticamente significativa. A mais evidente refere-se à diminuição do serotipo 19A que em 2008 (n=28, 15,1%) é o mais frequente, enquanto em 2009 é

apenas o quarto ($n=20$, 9,3%). Porém, esta diminuição não é significativa pelo teste exacto de Fisher ($p=0,0898$). Alguns serotipos só se apresentam num dos anos, ou seja, encontram-se sete serotipos (7C, 15C, 18A, 31, 34, 35B, 36) apenas em 2008 e três serotipos (16F, 18C, 33A) e uma estirpe NT apenas em 2009 (Figura 2).

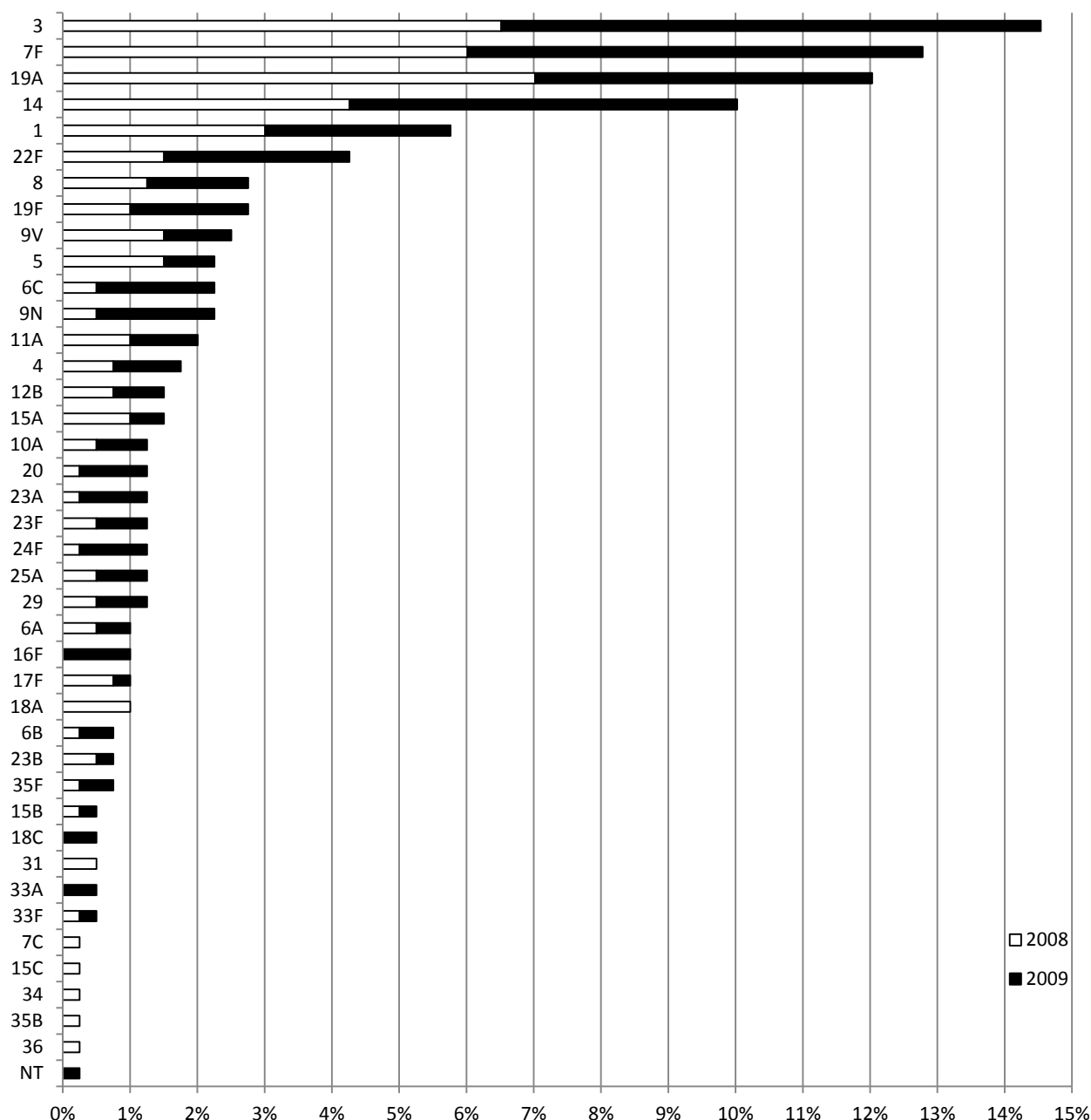


Figura 2 – Prevalência dos serotipos durante os anos 2008 e 2009.

A percentagem total de cada serotipo no conjunto dos dois anos foi calculada pela divisão do número de estirpes recolhido em cada ano pelo número total de estirpes ($n=399$) e, depois, pela soma das percentagens que cada ano contribuiu. Assim, as percentagens apresentadas pelos serotipos num determinado ano não reflectem a sua proporção nesse mesmo ano, mas sim a proporção no conjunto dos dois anos.

3.2.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos

Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos penicilina, amoxicilina, cefotaxima, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, co-trimoxazol, levofloxacina, cloranfenicol, telitromicina, linezolid e vancomicina foram determinados. A frequência de estirpes resistentes a cada antibiótico não apresenta alterações significativas entre os dois anos em estudo. A resistência à cefotaxima aumenta de 2,2% (n=4) em 2008 para 7,0% (n=15) em 2009 e este aumento é significativo segundo o teste exacto de Fisher ($p=0,0319$). No entanto, deixa de o ser após a correcção de FDR ($p=0,3190$).

Assim, os antimicrobianos que apresentam uma maior frequência de estirpes resistentes no período dos dois anos são a eritromicina (n=84, 21,1%), a penicilina (n=80, 20,1%), o co-trimoxazol (n=72, 18,1%), a tetraciclina (n=61, 15,3%) e a clindamicina (n=59, 14,8%) (Quadro 6). Todas as estirpes incluídas neste estudo são sensíveis ao linezolid e à vancomicina. Também se verifica que 144 estirpes (36,1%) são resistentes a pelo menos um antimicrobiano estudado e que quase metade destas (n=68, 17,0%) são consideradas multi-resistentes. A multi-resistência é definida como a resistência a pelo menos três classes de antibióticos (Quadro 2).

A maior parte das estirpes não susceptíveis à penicilina apresenta resistência intermédia (n=67, 83,8%), enquanto 13 estirpes (16,3%) têm resistência elevada (Quadro 6). Quanto à amoxicilina, apenas se encontram estirpes que apresentam resistência intermédia, enquanto para a cefotaxima encontra-se uma estirpe que apresenta resistência elevada e 18 estirpes que apresentam resistência intermédia.

A penicilina e a eritromicina representam duas classes de antimicrobianos muito importantes no tratamento das infecções pneumocócicas. A proporção de estirpes simultaneamente resistentes a estes dois antibióticos é de 13,0% (n=52).

Quadro 6 – Frequência de estirpes resistentes aos antimicrobianos estudados.

Antimicrobianos	Número de estirpes (%)		
	Resistência intermédia	Resistência elevada	Resistentes ^a
Penicilina	67 (16,8)	13 (3,3)	80 (20,1)
Amoxicilina	10 (2,5)	-	10 (2,5)
Cefotaxima	18 (4,5)	1 (0,3)	19 (4,8)
Eritromicina	4 (1,0)	80 (20,1)	84 (21,1)
Clindamicina	1 (0,3)	58 (14,5)	59 (14,8)
Tetraciclina	5 (1,3)	56 (14,0)	61 (15,3)
Co-trimoxazol	15 (3,8)	57 (14,3)	72 (18,1)
Levofloxacina	1 (0,3)	2 (0,5)	3 (0,8)
Cloranfenicol	-	7 (1,8)	7 (1,8)
Telitromicina	1 (0,3)	1 (0,3)	2 (0,5)
Linezolid	-	-	-
Vancomicina	-	-	-

^aO número de estirpes resistentes é a soma das estirpes que apresentam resistência intermédia e resistência elevada.

3.2.2.1. Fenotipos de resistência aos macrólidos

Verifica-se que todas as estirpes resistentes à clindamicina também o são à eritromicina, definindo o fenotipo de resistência MLS_B . As outras estirpes resistentes à eritromicina, mas susceptíveis à clindamicina, representam o fenotipo M. Assim, 59 estirpes (14,8%) apresentam o fenotipo MLS_B e 25 (6,3%) apresentam o fenotipo M. Apesar do fenotipo MLS_B ser mais frequente, ambos os fenotipos incluem estirpes de um número semelhante de serotipos diferentes (Figura 3). Porém, só alguns destes serotipos estão associados significativamente a um determinado fenotipo. Assim, a probabilidade de encontrar os serotipos 6C ($p=0,0050$), 15A ($p=0,0002$), 19A ($p<10^{-4}$) e 19F ($p=0,0143$) na população que apresenta o fenotipo MLS_B ($n=59$) é significativamente maior que a probabilidade de os encontrar na restante população ($n=340$). Da mesma forma, só o serotipo 14 ($p<10^{-4}$) está associado ao fenotipo M. Os valores-p apresentados foram calculados pelo teste exacto de Fisher após correcção de FDR.

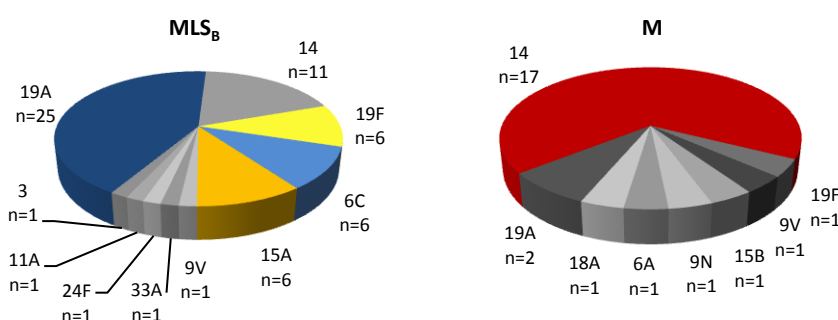


Figura 3 – Serotipos associados aos fenotipos de resistência aos macrólidos.

Os serotipos que apresentam uma associação significativa com um fenotipo estão coloridos, enquanto os restantes estão em escala de cinza.

3.2.2.2. Relação entre o serotipo e a susceptibilidade aos antimicrobianos

Não se verifica uma alteração significativa da frequência de estirpes resistentes em cada serotipo entre 2008 e 2009. Só o aumento de 2008 ($n=7$ em 17 estirpes) para 2009 ($n=18$ em 23 estirpes) da frequência de estirpes não susceptíveis à penicilina do serotipo 14 é significativo pelo teste exacto de Fisher ($p=0,0235$), mas, após a correcção de FDR, deixa de o ser ($p=0,9638$).

Apesar da grande diversidade de serotipos encontrada, apenas 6 (6C, 9V, 14, 15A, 19A e 19F) estão associados significativamente com a resistência aos antimicrobianos estudados (Quadro 7) e dois deles, 14 e 19A, representam mais de metade (51,4%, $n=74$) das estirpes resistentes a pelo menos um antibiótico. Também se identifica serotipos maioritariamente sensíveis aos antibióticos: 1 ($p=0,0173$), 3 ($p<10^{-4}$), 7F ($p<10^{-4}$) e 22F ($p=0,0361$). Esta associação é significativa devido à elevada frequência destes serotipos na população. No entanto, há 15 serotipos (4, 6B, 7C, 15C, 16F, 17F, 18C, 20, 23B,

25A, 31, 33F, 35B, 35F, 36) que apenas apresentam estirpes susceptíveis a todos os antimicrobianos estudados, não se tendo obtido resultados significativos porque a sua frequência é baixa. A estirpe NT também se apresenta como sensível a todos os antimicrobianos testados.

Os serotipos 6C, 14, 15A e 19A estão associados à não susceptibilidade à penicilina (Quadro 7). Porém, entre as estirpes com resistência elevada, além dos serotipos 14 (n=9) e 19A (n=2), também se encontra o serotipo 19F (n=2), apesar de não estar associado significativamente à resistência à penicilina. Uma das estirpes com resistência elevada à penicilina e do serotipo 19F é a única que apresenta uma resistência elevada à cefotaxima. Porém, para a cefotaxima só se encontra uma associação com a resistência para o serotipo 14 (Quadro 7).

Nesta colecção, os serotipos 19A (n=28) e 14 (n=21) são os que apresentam mais estirpes multi-resistentes. Os serotipos 6C, 15A e 19F, apesar do número baixo de estirpes, também estão associados com a multi-resistência (Quadro 7), salientando-se o facto de todas as estirpes 15A serem multi-resistentes (incluindo a resistência simultânea a penicilina e eritromicina).

Quadro 7 – Relação dos serotipos com a resistência aos antimicrobianos.

Serotipo	Número de estirpes (valor-p) ^a									
	Total	R ^b	MR ^b	Resistentes a:						
				PEN ^b	CT ^b	ER ^b	CM ^b	TC ^b	SXT ^b	PEN+ER ^b
6C	9	7 (0,0517)	6 (0,0075)	7 (0,0019)	0 (1,0000)	6 (0,0228)	6 (0,0053)	6 (0,0089)	0 (1,0000)	6 (0,0019)
9V	10	9 (0,0041)	1 (1,0000)	4 (0,4763)	1 (1,0000)	2 (1,0000)	1 (1,0000)	1 (1,0000)	8 (0,0004)	0 (1,0000)
14	40	38 ($<10^{-4}$)	18 (0,0002)	25 ($<10^{-4}$)	13 ($<10^{-4}$)	28 ($<10^{-4}$)	11 (0,1867)	6 (1,0000)	21 ($<10^{-4}$)	16 (0,0001)
15A	6	6 (0,0121)	6 (0,0003)	6 (0,0005)	0 (1,0000)	6 (0,0007)	6 (0,0002)	3 (0,3044)	0 (1,0000)	6 (0,0001)
19A	48	36 ($<10^{-4}$)	28 ($<10^{-4}$)	24 ($<10^{-4}$)	3 (1,0000)	27 ($<10^{-4}$)	25 ($<10^{-4}$)	27 ($<10^{-4}$)	23 ($<10^{-4}$)	19 ($<10^{-4}$)
19F	11	10 (0,0019)	6 (0,0265)	5 (0,2368)	2 (1,0000)	7 (0,0170)	6 (0,0153)	6 (0,0242)	2 (1,0000)	3 (0,7364)

^aOs valores a negrito indicam uma associação significativa. Os valores-p apresentados foram obtidos após correcção de FDR dos valores calculados pelo teste exacto de Fisher. Só estão apresentados os serotipos e os antimicrobianos em que houve resultados significativos.

^bR – resistentes a pelo menos um antibiótico testado; MR – multi-resistentes; PEN – penicilina; CT – cefotaxima; ER – eritromicina; CM – clindamicina; TC – tetraciclina; SXT – co-trimoxazol; PEN+ER – resistência simultânea a penicilina e eritromicina.

3.3. Representação dos serotipos incluídos nas vacinas pneumocócicas

Nesta amostra encontram-se 78 estirpes (19,5%) cujos serotipos fazem parte da formulação da PCV7 (Figura 4). Considerando as vacinas recentemente licenciadas, PCV10 e PCV13, verifica-se que 161 (40,4%) e 271 (67,9%) estirpes apresentam serotipos incluídos nestas vacinas, respectivamente. Quanto à vacina PPV23, são identificadas 330 estirpes (82,7%) de serotipos incluídos nesta vacina. Os serotipos não pertencentes às vacinas conjugadas totalizam 128 estirpes (32,1%) e os não pertencentes à vacina PPV23 apresentam 69 estirpes (17,3%).

Quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, as estirpes que apresentam serotipos incluídos nas vacinas PCV7, PCV10, PCV13 e PPV23 representam 41,7% (n=60), 47,9% (n=69), 77,1% (n=111) e 81,9% (n=118), respectivamente, do número total de estirpes resistentes a pelo menos um antibiótico (n=144) (Figura 4). Em relação às estirpes multi-resistentes (n=68), a sua representação nas vacinas é a mesma para as vacinas PCV7 e PCV10 (n=25, 36,8%), enquanto nas vacinas PCV13 e PPV23 é de 79,4% (n=54) e 80,9% (n=55), respectivamente.

Entre as estirpes simultaneamente resistentes à penicilina e eritromicina (n=52), 36,5% (n=19) apresentam serotipos incluídos nas vacinas PCV7 e PCV10, enquanto para as vacinas PCV13 e PPV23 esta representação é de 75,0% (n=39) e 73,1% (n=38), respectivamente.

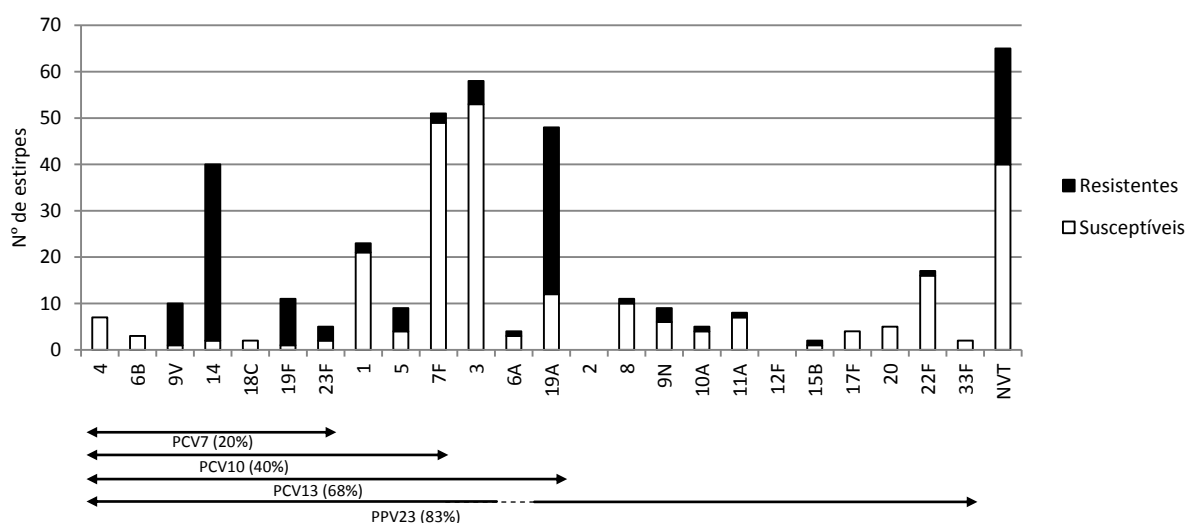


Figura 4 – Frequência e susceptibilidade aos antimicrobianos dos serotipos incluídos nas vacinas pneumocócicas.

Em cada serotipo está indicado o número de estirpes resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos estudados. Entre parêntesis está a representação dos serotipos incluídos em cada uma das vacinas. O tracejado indica que o serotipo 6A não pertence à vacina PPV23. Os serotipos 2 e 12F, incluídos na vacina PPV23, não foram encontrados nesta população. Os serotipos não incluídos em qualquer uma das vacinas (NVT) representam 16% da população.

3.4. Distribuição dos ferotipos e a sua associação com o serotipo e a susceptibilidade aos antimicrobianos

No total das 399 estirpes, 289 são do ferotipo CSP-1 (72,4%) e 103 do CSP-2 (25,8%), não se tendo conseguido identificar o ferotipo de sete estirpes (1,8%). Destas sete estirpes, cinco não amplificaram qualquer fragmento mesmo após a alteração das concentrações dos reagentes e da temperatura de hibridação do PCR. As outras duas estirpes apresentaram fragmentos com dimensões diferentes das esperadas. Num dos casos, o fragmento era ligeiramente maior que o de CSP-1 e, após sequenciação, foi verificado que havia uma duplicação dentro da sequência do alelo de CSP-1. No outro caso, o fragmento apresentou uma dimensão elevada na ordem de 5 mil pares de bases, não tendo sido sequenciado.

A associação do serotipo com os ferotipos foi avaliada, tendo sido estabelecidas associações significativas (Quadro 8). Um *odds ratio* (OR) maior que 1 indica que a probabilidade de encontrar um determinado serotipo entre as estirpes CSP-1 é maior que a probabilidade de o encontrar nas estirpes CSP-2, enquanto o inverso ocorre para um OR menor que 1. Por exemplo, o serotipo 19A está associado a CSP-2 apesar de ter um número semelhante de estirpes de cada ferotipo. Esta associação é significativa porque a proporção deste serotipo é maior nas estirpes CSP-2 do que nas do ferotipo CSP-1. Assim, os serotipos 1, 7F, 14 e 22F estão associados significativamente a CSP-1 e os serotipos 4, 6C, 9N, 10A, 19A, e 19F a CSP-2.

Também foi testado se os ferotipos estavam relacionados com a resistência aos antimicrobianos. Só o ferotipo CSP-2 apresenta associações significativas, estando associado com a resistência aos antimicrobianos penicilina, eritromicina, clindamicina e tetraciclina (Quadro 9).

Quadro 8 – Associações significativas entre serotipo e ferotipo.

Serotipo	CSP-1	CSP-2	OR (I.C. 95%) ^a	Valor-p ^b
1	23	0	Inf (2,17-Inf)	0,0047
4	0	7	0 (0-0,24)	0,0007
6C	1	8	0,04 (0,0009-0,32)	0,0009
7F	50	1	21,26 (3,54-864,48)	<10 ⁻⁴
9N	1	8	0,04 (0,0009-0,32)	0,0009
10A	0	5	0 (0-0,38)	0,0047
14	40	0	Inf (4,17-Inf)	<10 ⁻⁴
19A	24	23	0,32 (0,16-0,62)	0,0020
19F	1	10	0,03 (0,0007-0,23)	0,0001
22F	17	0	Inf (1,52-Inf)	0,0318
24F	0	5	0 (0-0,38)	0,0047

^aOR: *Odds ratio* e respectivo intervalo de confiança (I.C. 95%). OR>1 indica uma associação de CSP-1 com o serotipo e OR<1 uma associação de CSP-2 com o serotipo. Esta associação significa que cada serotipo possui mais estirpes de um determinado ferotipo do que seria de esperar em caso de independência entre serotipo e ferotipo. Só estão apresentados os serotipos com associações significativas. Inf – infinito.

^bOs valores-p apresentados foram obtidos após correcção de FDR dos resultados calculados pelo teste exacto de Fisher.

Quadro 9 – Associação entre resistência aos antimicrobianos e ferotipo.

Antibiótico	CSP-1		CSP-2		OR (I.C. 95%) ^a	Valor-p ^b
	Não susceptíveis	Susceptíveis	Não susceptíveis	Susceptíveis		
Penicilina	45	244	35	68	0,36 (0,21-0,62)	0,0006
Amoxicilina	8	281	2	101	1,44 (0,28-14,11)	1,0000
Cefotaxima	15	274	4	99	1,35 (0,42-5,74)	0,9885
Eritromicina	50	239	33	70	0,44 (0,26-0,77)	0,0074
Clindamicina	29	260	29	74	0,29 (0,15-0,53)	0,0002
Tetraciclina	23	266	37	66	0,16 (0,08-0,29)	<10⁻⁴
Co-trimoxazol	48	241	22	81	0,73 (0,41-1,36)	0,5915
Levofloxacina	2	287	0	103	Inf (0,07-Inf)	1,0000
Cloranfenicol	4	285	2	101	0,71 (0,10-7,96)	0,9362
Telitromicina	1	288	1	102	0,36 (0,005-28,07)	0,7616

^aOR: *Odds ratio* e respectivo intervalo de confiança (I.C. 95%). Para os antimicrobianos com valores-p significativos, OR>1 indica que CSP-1 está associado à resistência ao respectivo antibiótico, enquanto OR<1 indica que é CSP-2 que está associado. Esta associação significa que cada ferotipo possui mais estirpes resistentes a um determinado antimicrobiano do que seria de esperar em caso de independência entre estas duas características. Inf – infinito.

^bA negrito estão os valores-p que estabelecem uma associação significativa entre ferotipo e resistência aos antimicrobianos. Os valores-p apresentados foram obtidos após correcção de FDR dos resultados calculados pelo teste exacto de Fisher.

3.5. Caracterização genotípica

3.5.1. *Multilocus sequence typing* (MLST)

No total identifica-se 85 STs diferentes distribuídos por 45 complexos clonais (Quadro 10). Os STs mais frequentes são: ST191 (n=24, serotipo 7F), ST180 (n=19, serotipo 3), ST306 (n=13, serotipo 1), ST156 (n=10, serotipos 9V e 14) e ST276 (n=9, serotipo 19A). Cada ST apresenta quase sempre só um serotipo. Os STs que apresentam mais do que um serotipo são: ST66 (9N e NT), ST100 (33A e 33F), ST156 (9V e 14), ST411 (15B e 15C) e ST1201 (7C e 19A). Nesta colecção pode-se encontrar três alelos que ainda não tinham sido identificados anteriormente: um no gene *ddl* (serotipo 19A, novo ST6174), um no gene *gdh* (serotipo 6B, novo ST6175) e um no gene *aroE* (serotipo 17F, novo ST6179). Também se pode encontrar três novos perfis alélicos: ST6176 (serotipo 3), ST6181 (serotipo 23F) e ST6182 (serotipo 36).

Quadro 10 – Complexos clonais e respectivos STs de cada serotipo.

Serotipo	Complexo Clonal ^a	STs ^b	Clone PMEN
1	CC306	306 (n=13)	Suécia ¹ -ST306
3	CC63	6176 (SLV) (n=1)	Suécia ^{15A} -ST63
	CC180	180 (n=19)	Holanda ³ -ST180
	CC260	260 (n=4), 1220 (n=1)	
	CC378	232 (n=2), 6014 (n=1)	
4	CC205	205 (n=2)	Suécia ⁴ -ST205
	CC246	246 (n=1)	
	CC5902	1222 (n=1)	
5	CC289	289 (n=4), 1223 (SLV) (n=1)	Columbia ⁵ -ST289
6A	CC460	65 (n=1)	
	CC473	473 (n=1), 1876 (n=1)	
6B	CC15	6175 (n=1)	
6C	CC156	1150 (DLV) (n=1)	Columbia ^{23F} -ST338
	CC315	386 (DLV) (n=1), 3396 (DLV) (n=1), 4310 (DLV) (n=1)	Polónia ^{6B} -ST315
	CC1390	1390 (n=1)	
7C	CC15	1201 (n=1)	
7F	CC191	191 (n=24)	Holanda ^{7F} -ST191
8	CC62	53 (n=5)	Holanda ⁸ -ST53
	CC1480	404 (n=1)	
9N	CC66	66 (SLV) (n=4)	Tennessee ¹⁴ -ST67
	CC3982	3982 (n=1)	
9V	CC156	156 (n=1), 162 (SLV) (n=1), 239 (NR) (n=1), 838 (SLV) (n=2)	Espanha ^{9V} -ST156
10A	CC460	97 (n=3)	
11A	CC62	62 (DLV) (n=2), 408 (DLV) (n=3)	Holanda ⁸ -ST53
12B	CC218	218 (n=2), 220 (SLV) (n=1)	Dinamarca ^{12F} -ST218
	CC989	989 (n=1)	
14	CC15	9 (n=4), 15 (SLV) (n=1), 409 (TLV) (n=2)	Inglaterra ¹⁴ -ST9
	CC156	143 (DLV) (n=2), 156 (n=9), 2511 (DLV) (n=1), 4576 (TLV) (n=1)	Espanha ^{9V} -ST156
15A	CC63	63 (n=3)	Suécia ^{15A} -ST63
15B	CC199	411 (SLV) (n=2)	Holanda ^{15B} -ST199
15C	CC199	411 (SLV) (n=1)	Holanda ^{15B} -ST199
16F	CC30	30 (n=2)	
17F	CC113	123 (DLV) (n=2)	Holanda ^{18C} -ST113
	CC156	6179 (n=1)	
18A	CC241	241 (n=2)	
19A	CC15	1201 (n=2)	
	CC177	193 (n=2)	Grécia ²¹ -ST193
	CC199	199 (n=1), 416 (DLV) (n=1)	Holanda ^{15B} -ST199
	CC230	276 (SLV) (n=9), 6174 (DLV) (n=1)	Dinamarca ¹⁴ -ST230
	CC320	320 (DLV) (n=1)	Taiwan ^{19F} -ST236
	CC1151	2732 (n=1)	
	CC2102	2102 (n=1), 2669 (n=1)	
	CC6158	994 (n=3), 4197 (n=1)	
19F	CC177	177 (n=2), 179 (SLV) (n=2), 391 (SLV) (n=1)	Portugal ^{19F} -ST177
	CC320	271 (SLV) (n=1)	Taiwan ^{19F} -ST236
20	CC235	235 (n=1)	
22F	CC113	1372 (n=1)	
	CC433	433 (n=8)	
23A	CC439	42 (DLV) (n=1), 311 (DLV) (n=1)	Tennessee ^{23F} -ST37
23B	CC439	439 (SLV) (n=2)	Tennessee ^{23F} -ST37
23F	CC156	338 (n=2), 6181 (SLV) (n=1)	Columbia ^{23F} -ST338
	CC439	33 (SLV) (n=1)	Tennessee ^{23F} -ST37
24F	CC79	72 (n=2)	
	CC230	230 (n=1)	Dinamarca ¹⁴ -ST230
25A	CC393	393 (n=4)	
29	CC198	198 (n=1)	
	CC1816	1342 (n=1), 2567 (n=1)	
31	CC3548	1766 (n=1)	
33A	CC100	100 (n=1)	
33F	CC100	100 (n=1)	
34	CC1884	1884 (n=1)	
35B	CC2690	2690 (n=1)	
35F	CC1368	1368 (n=2)	
36	CC5406	6182 (n=1)	
NT	CC66	66 (SLV) (n=1)	Tennessee ¹⁴ -ST67

^aOs complexos clonais foram definidos pelo algoritmo goeBURST³¹. Cada complexo clonal contém os STs que estão na mesma linhagem genética.

^bEntre parêntesis está indicada a relação dos STs com o clone PMEN associado: SLV – *single locus variant*; DLV – *double locus variant*; TLV – *triple locus variant*; NR - não relacionado (com 4 ou mais diferenças).

3.5.2. Análise por serotipo dos perfis obtidos por PFGE

Para cada estirpe da colecção foi obtido por PFGE um perfil de bandas de DNA. Na Figura 5 representa um gel de PFGE com exemplos de perfis de bandas de estirpes maioritariamente do serotipo 7F. Os perfis de bandas obtidos por PFGE foram analisados pela construção de dendrogramas para cada serotipo. Nesta secção serão analisados apenas alguns serotipos. O critério de escolha foi a sua relevância em termos de frequência na população (1, 3, 7F e 22F) e associação com a resistência aos antimicrobianos (6C, 9V, 14, 15A, 19A e 19F). Também se apresenta nos dendrogramas o ST, o ferotipo e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das estirpes. Não se aplicou a técnica de MLST a todas as estirpes, pelo que esta informação não está completa.

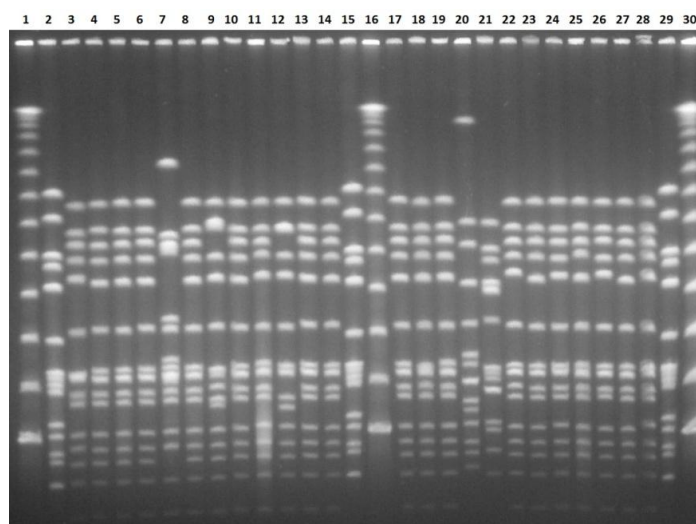


Figura 5 – Perfis de bandas de DNA obtidos por PFGE.

Os perfis são todos de estirpes do serotipo 7F com as seguintes excepções: pistas 1, 16 e 30 são o marcador molecular *Lambda Ladder PFG Marker*; pistas 2, 15 e 29 representam a estirpe R36A; pistas 20 e 21 pertencem a estirpes dos serotipos 19A e 23F, respectivamente.

O serotipo 1 apresenta dois clones de PFGE. O clone A deste serotipo engloba a maioria das estirpes, enquanto o clone B está representado apenas por uma estirpe (Figura 6). Só se encontra o ST306 no clone A, representando o clone PMEN Suécia¹-ST306 (Quadro 10). Todas as estirpes deste serotipo pertencem ao ferotipo CSP-1.

O serotipo 22F forma dois clones de PFGE. A maioria das estirpes agrupa-se no clone A deste serotipo (onde só se encontra o ST433), enquanto o clone B apresenta apenas uma estirpe (ST1372) (Figura 6). Os dois STs apresentados também estão em complexos clonais distintos (Quadro 10), havendo, de facto, duas linhagens neste serotipo.

Tal como no serotipo 1, a maior parte das estirpes do serotipo 3 encontra-se agrupada num único clone de PFGE (clone A deste serotipo), enquanto o clone B está representado apenas por uma

estirpe que apresenta multi-resistência (Figura 6). Porém, o clone A, ao nível de 87% de semelhança, forma dois grupos que correspondem a dois ferotipos diferentes. Só uma estirpe CSP-1 (ST180) está entre as estirpes CSP-2. As estirpes CSP-1 do clone A apresentam o mesmo ST (ST180), representando o clone Holanda³-ST180 (Quadro 10). As estirpes CSP-2, apesar de estarem distribuídas por dois complexos clonais (Quadro 10), são relativamente próximas, pois o ST260 tem apenas três diferenças (TLV) dos ST232 e ST6014. A estirpe do clone B (ST6176) encontra-se no CC63, onde também está incluído o ST63. Este ST foi encontrado no serotipo 15A (Quadro 10) e apresenta apenas uma diferença (SLV) em relação ao ST6176.

O serotipo 7F apresenta só um clone de PFGE (Figura 6). Neste serotipo só se encontra o ST191 que representa o clone Holanda^{7F}-ST191 (Quadro 10). Uma parte significativa das estirpes apresenta uma semelhança de 100%, o que demonstra a pouca diversidade genética que existe neste serotipo. Devido à homogeneidade observada, era esperado que todas as estirpes apresentassem o mesmo ferotipo. No entanto, uma das estirpes pertence a um ferotipo diferente (CSP-2).

O serotipo 6C apresenta cinco clones de PFGE, quatro deles apenas com uma estirpe (Figura 6). O perfil de susceptibilidade das estirpes do clone A é igual. Os STs apresentados neste serotipo são todos diferentes, mas os que se encontram no clone A pertencem ao mesmo complexo clonal e estão relacionados com o clone Polónia^{6B}-ST315 (Quadro 10). A maioria das estirpes apresenta o ferotipo CSP-2, havendo apenas uma estirpe CSP-1.

O serotipo 15A apresenta só um clone de PFGE (Figura 6), onde só se encontra o ST63 que representa o clone Suécia^{15A}-ST63. O perfil de susceptibilidade das estirpes é semelhante, apenas diferindo na susceptibilidade à tetraciclina.

O serotipo 14 apresenta dois clones de PFGE. Todas as estirpes do clone A deste serotipo apresentam resistência à penicilina (Figura 6), enquanto as estirpes do clone B são todas resistentes à eritromicina, com excepção de duas que são sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Os STs de cada clone encontram-se, de facto, em dois complexos clonais diferentes (Quadro 10), representando dois clones internacionais, Inglaterra¹⁴-ST9 e Espanha^{9V}-ST156.

O serotipo 19A é o que apresenta maior diversidade genética entre as suas estirpes. Neste serotipo pode-se distinguir 15 clones de PFGE, dos quais cinco são constituídos por uma única estirpe (Figura 6). As estirpes deste serotipo também apresentam muitos STs diferentes que se distribuem por oito complexos clonais e estão associados a quatro clones PMEN (Quadro 10). Só os clones A e F é que não apresentam qualquer resistência aos antimicrobianos. O clone L possui o maior número de estirpes (13), sendo todas não susceptíveis à penicilina, eritromicina e clindamicina, portanto, multi-resistentes. O ST que apresenta maior frequência neste clone é o ST276 que está relacionado com o clone Dinamarca¹⁴-ST230. Também se verifica que a maioria dos clones de PFGE possui estirpes do mesmo ferotipo, com excepção de apenas dois (clones C e I). Não se conseguiu definir o ferotipo de

uma estirpe do serotipo 19A porque esta apresentava um fragmento ligeiramente maior que o de CSP-1 (ver secção 3.4).

O serotipo 9V é composto por dois clones de PFGE. O clone B apresenta estirpes resistentes apenas ao co-trimoxazol (Figura 6). Este clone tem uma estirpe ST239 que, apesar de se encontrar no mesmo complexo clonal que os STs apresentados no clone A (Quadro 10), tem seis diferenças relativamente a estes. Os STs que se encontram no clone representado por A estão relacionados com o clone Espanha^{9V}-ST156 e apresentam apenas uma diferença entre si no gene *ddl*.

O serotipo 19F apresenta dois clones de PFGE (Figura 6). Os STs apresentados nestes clones também se distribuem por dois complexos clonais (Quadro 10). No entanto, o ST177, o ST179 e o ST391, apesar de estarem no mesmo complexo clonal (CC177) e estarem relacionados com o mesmo clone internacional (Portugal^{19F}-ST177), pertencem a clones de PFGE diferentes. Só uma das estirpes não apresenta o serotipo CSP-2 (ST271) e está relacionada com o clone Taiwan^{19F}-ST236 (Quadro 10).

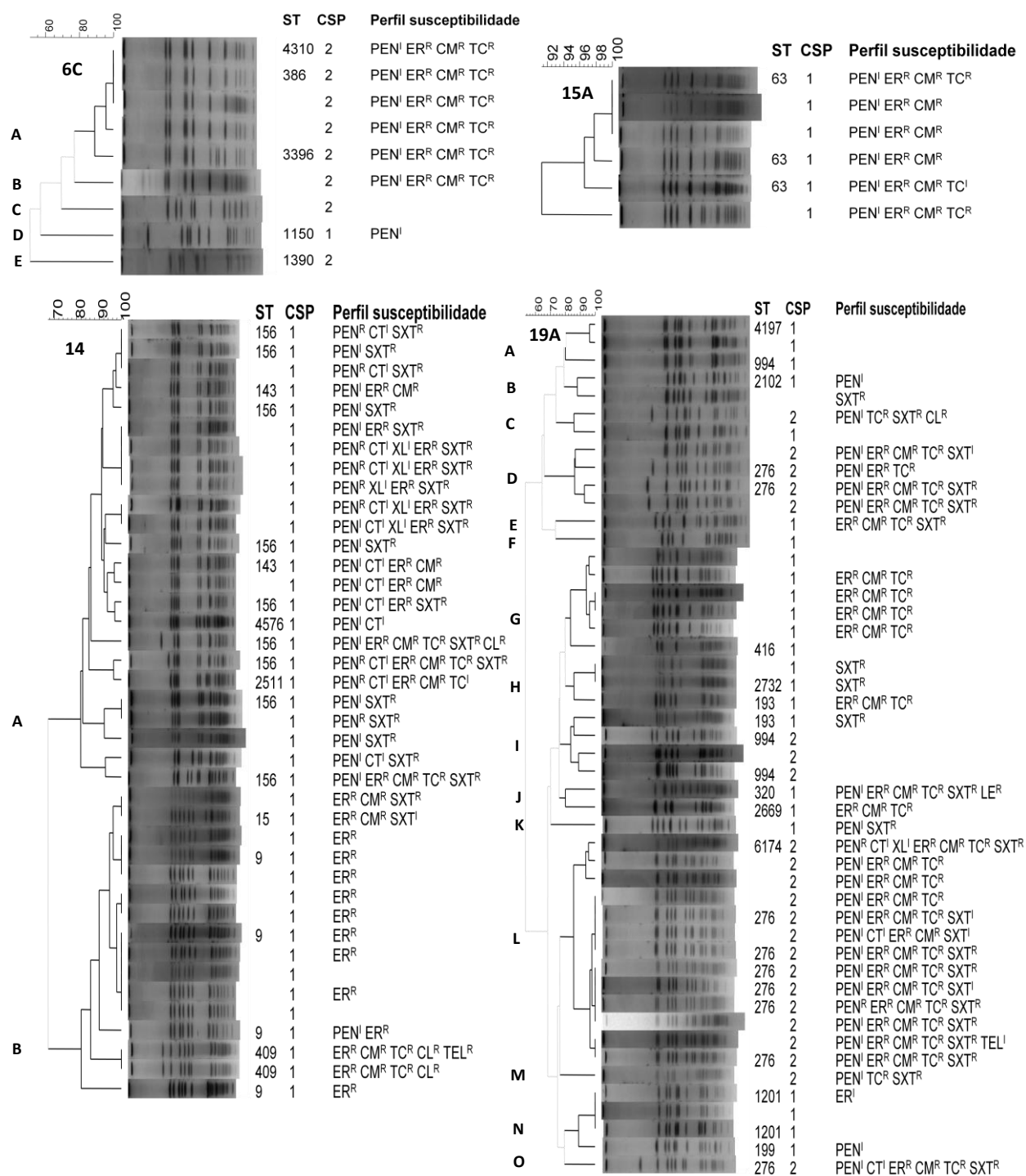


Figura 6 (continuação) – Dendrogramas dos perfis obtidos por PFGE dos serotipos 1, 22F, 3, 7F, 6C, 15A, 14, 19A, 9V e 19F.

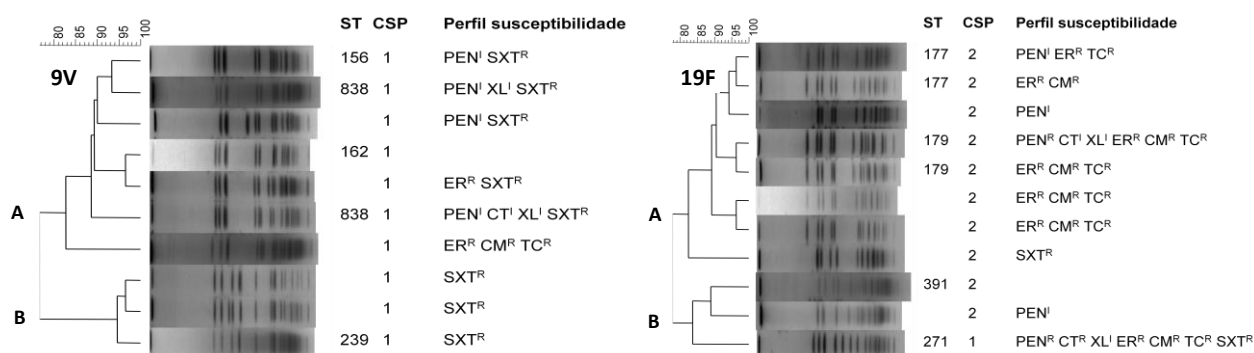


Figura 6 (continuação) – Dendrogramas dos perfis obtidos por PFGE dos serotipos 1, 22F, 3, 7F, 6C, 15A, 14, 19A, 9V e 19F.

A escala associada a cada dendrograma representa em percentagem os valores de semelhança entre os perfis, calculados pelo coeficiente de Dice. As ligações no dendrograma que estão a cinzento indicam uma semelhança <80%. Nas colunas “ST” e “CSP”, os espaços em branco indicam que estas características não foram determinadas. Na coluna “Perfil susceptibilidade”, os espaços em branco indicam que as estirpes são sensíveis a todos os antimicrobianos testados. ^R (resistência elevada) e ^I (resistência intermédia) indicam o nível de resistência aos antimicrobianos: PEN – penicilina, CT – cefotaxima, XL – amoxicilina ER – eritromicina, CM – clindamicina, TC – tetraciclina, SXT – co-trimoxazol, LE – levofloxacina, CL – cloranfenicol, TEL – telitromicina. ST – *sequence type*; CSP – péptido estimulador da competência.

3.6. Congruência entre os métodos de tipagem

A análise da congruência entre os métodos de tipagem permite saber quais são os mais discriminatórios e se é possível inferir o resultado de um método através do resultado de outro.

Para analisar a congruência entre os métodos de tipagem, só foram utilizadas as estirpes que tinham todas as características determinadas, ou seja, foram excluídas desta análise as que não tinham o ST e o ferotipo estabelecidos. Assim, os resultados de 207 estirpes foram comparados em relação ao serotipo, PFGE, ST e ao agrupamento em complexos clonais. O agrupamento foi realizado pelo algoritmo goeBURST e, quanto ao PFGE, construiu-se um dendrograma com as 207 estirpes e atribuiu-se um número diferente a cada clone de PFGE com um nível de semelhança de pelo menos 80%. Os métodos de tipagem também foram comparados com o ferotipo.

Analisando os índices de diversidade de Simpson de cada método, verifica-se que a classificação das estirpes apenas pelo ST (SID=0,967; I.C. 95%: 0,956-0,978) origina uma maior diversidade que a serotipagem (SID=0,937; I.C. 95%: 0,923-0,950) e o PFGE (SID=0,940; I.C. 95%: 0,925-0,954), pois os seus intervalos de confiança de 95% não se sobrepõem. Porém, quando se considera as estirpes agrupadas em complexos clonais (SID=0,950; I.C. 95%: 0,939-0,961), a diversidade entre os métodos não é distinguível. Assim, apenas a classificação das estirpes recorrendo somente ao ST apresenta um poder discriminatório maior que a serotipagem e o PFGE. No entanto, se for considerado o valor 100% em vez de 80% de semelhança, o PFGE torna-se mais discriminatório que o MLST (SID=0,979; I.C. 95%: 0,970-0,988).

A análise dos coeficientes de Wallace reforça a conclusão de que a tipagem por ST apresenta um poder discriminatório superior. O coeficiente de Wallace permite avaliar a relação entre os métodos num sentido unidireccional. Assim, a probabilidade de duas estirpes que têm o mesmo ST apresentarem o mesmo serotipo é de 97,5% e de estarem agrupadas no mesmo clone de PFGE é de 89,7% (Quadro 11). Esta probabilidade é significativamente maior (não há sobreposição dos I.C. 95%) que a probabilidade de duas estirpes com o mesmo serotipo apresentarem o mesmo ST (50,9%) e de duas estirpes no mesmo clone de PFGE terem também o mesmo ST (49,2%). Assim, a classificação por ST subdivide a classificação por serotipo e por PFGE. Se for utilizado o agrupamento das estirpes em complexos clonais para comparação, a diferença nas probabilidades deixa de ser significativa, apesar de continuar a ser superior (Quadro 11). Também se verifica que os dois coeficientes de Wallace entre a serotipagem e o PFGE são muito semelhantes, indicando que a probabilidade de duas estirpes com o mesmo serotipo serem agrupadas no mesmo clone de PFGE é igual à situação inversa. Assim, a congruência entre serotipagem, PFGE e MLST é relativamente elevada, mas é necessário ter em conta os resultados dos diferentes métodos de tipagem para avaliar a relação genética entre as estirpes.

Quanto ao ferotipo, observa-se que a probabilidade de inferir o tipo de CSP codificado por cada estirpe a partir dos métodos de tipagem é elevada (última coluna do Quadro 11). Esta probabilidade é praticamente 100% para os resultados de MLST, o que indica que o ferotipo é uma propriedade clonal.

Quadro 11 – Congruência entre os métodos de tipagem pelos coeficientes de Wallace e respectivos I.C. 95%.

Métodos	Serotipagem	PFGE	ST ^a	CC ^a	Ferotipo
W _i ^b	0,063	0,060	0,033	0,050	0,617
Serotipagem		0,642 (0,499-0,787)	0,509 (0,373-0,644)	0,590 (0,466-0,713)	0,758 (0,664-0,851)
PFGE	0,675 (0,557-0,795)		0,492 (0,360-0,625)	0,604 (0,473-0,734)	0,809 (0,709-0,907)
ST ^a	0,975 (0,943-1,000)	0,897 (0,825-0,974)		1,000 (1,000-1,000)	0,997 (0,990-1,000)
CC ^a	0,751 (0,630-0,872)	0,731 (0,613-0,852)	0,664 (0,518-0,812)		0,987 (0,969-1,000)
Ferotipo	0,078^c (0,061-0,095)	0,079 (0,061-0,097)	0,053 (0,037-0,070)	0,080 (0,063-0,096)	

^aST – *sequence type*, CC – complexos clonais.

^bW_i é o coeficiente de Wallace esperado em caso de independência⁶⁰.

^cA negrito está assinalado o coeficiente de Wallace cujo intervalo de confiança de 95% inclui o W_i. Os I.C. 95% foram calculados pelo método de *jackknife*⁶⁸.

Capítulo 4 – Discussão dos Resultados

Neste trabalho estudou-se a população de *S. pneumoniae* responsável por infecções invasivas em idosos em Portugal durante 2008 e 2009. Esta população foi comparada com os resultados do período pré-vacinal^{3,67} em relação à distribuição dos serotipos e às taxas de não susceptibilidade aos antimicrobianos. Desde que foi introduzida em 2001 em Portugal, a PCV7 alterou a estrutura da população pneumocócica nas crianças e também provocou um efeito de imunidade de grupo nos adultos. No entanto, em Portugal os efeitos da PCV7 só foram notados nas crianças e nos adultos um ano e dois anos depois da sua introdução, respectivamente³. Assim, Aguiar e colaboradores observaram que entre 2003 e 2004 houve a maior diferença na distribuição dos serotipos em infecções invasivas nos adultos em Portugal e definiram o período pré-vacinal até ao ano de 2003³.

Neste trabalho foi utilizada a mesma definição de período pré-vacinal, ou seja, considerou-se os anos entre 1999 e 2003 como pertencentes a este período. O número de estirpes invasivas em idosos (indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos) no período pré-vacinal foi menor (n=205) apesar de cobrir um número superior de anos (1999, n=29; 2000, n=34; 2001, n=43; 2002, n=38; 2003, n=61)^{3,67}. No início do estudo de vigilância do Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias foram recolhidas poucas estirpes. O seu número foi aumentando ao longo dos anos, devido, provavelmente, a uma maior preocupação dos laboratórios com a doença invasiva pneumocócica por causa da introdução da vacina PCV7 e do debate sobre o uso da PPV23³. Assim, o número crescente de estirpes não indica um aumento do número de casos de infecções pneumocócicas. Como não foi feita nenhuma auditoria aos laboratórios, não se pode inferir a incidência das infecções pneumocócicas nos idosos em Portugal a partir do número de estirpes da colecção estudada. Assim, com estes resultados não se pode estimar o efeito das vacinas na incidência das infecções pneumocócicas, mas pode avaliar-se se houve alguma alteração na prevalência dos serotipos nas infecções invasivas em idosos.

4.1. Distribuição dos serotipos

A prevalência dos serotipos das estirpes invasivas em idosos nos períodos pré-vacinal e 2008-2009 foram comparadas. A diferença entre a proporção de cada serotipo nos dois períodos foi avaliada pelo teste exacto de Fisher com correcção de FDR. Em 1999-2003 houve 35 serotipos diferentes e a diversidade da população (SID=0,941; I.C. 95%: 0,927-0,956) não se alterou em 2008-2009 (SID=0,929; I.C. 95%: 0,918-0,939). No entanto, houve diferenças na prevalência dos serotipos. Os mais prevalentes em 1999-2003 foram os serotipos 3 (n=33), 14 (n=25), 1 (n=11), 19A (n=10) e 8 (n=10)^{3,67}. Em 2008-2009 o serotipo 3 manteve-se como o mais prevalente, mas os outros quatro mais prevalentes foram 7F, 19A, 14 e 1. O 7F, o segundo mais encontrado em 2008-2009, foi o único que teve uma variação significativa entre os dois períodos após correcção de FDR. Este serotipo aumentou de 3,4% (n=7) em

1999-2003 para 12,8% (n=51) em 2008-2009 ($p=0,0051$). Sem a correcção de FDR, as alterações significativas foram o aumento do 19A (de 4,9%, n=10, para 12,0%, n=58) e as diminuições do 6B (de 3,4%, n=7, para 0,8%, n=3) e do 18C (de 2,9%, n=6, para 0,5%, n=2). Assim, os serotipos que aumentaram não estão incluídos na PCV7, enquanto os serotipos que diminuíram estão incluídos nesta vacina.

Considerando todos os serotipos incluídos na PCV7, verifica-se que houve uma diminuição significativa da sua representação de 29,8% (n=61), em 1999-2003, para 19,5% (n=78), em 2008 e 2009, ($p=0,0058$). Esta diminuição indica que continuou a ocorrer um efeito de imunidade de grupo nos idosos devido à utilização da PCV7 na vacinação pediátrica. Esta conclusão é reforçada pelo facto dos efeitos indirectos da PCV7 nos idosos já terem sido descritos anteriormente não só em Portugal³ como noutros países^{6,53,59}. Além da diminuição dos serotipos incluídos na PCV7, também tem sido descrito nestes países um aumento de alguns serotipos não incluídos nesta vacina, tal como foi observada a expansão dos serotipos 7F e 19A neste trabalho. Assim, nos EUA⁵⁹, em Inglaterra⁵³ e em Espanha⁶ foi descrito um aumento significativo dos serotipos 7F e 19A nos idosos após a introdução da PCV7. No entanto, a introdução da PCV7 na vacinação pediátrica poderá não ter sido o factor principal para a expansão dos serotipos 7F e 19A, pois a distribuição dos serotipos altera-se naturalmente com o tempo mesmo na ausência de vacinas³⁷ e a pressão selectiva imposta pelo consumo de antibióticos também tem um papel importante na prevalência dos serotipos (ver secção 4.2). A diminuição dos serotipos incluídos na vacina PCV7 poderia ter sido influenciada pela PPV23, uma vez que estes serotipos também fazem parte da sua composição. No entanto, a prevalência do conjunto dos serotipos incluídos na PPV23 não se alterou entre o período pré-vacinal (81,5%, n=167) e 2008-2009 (82,7%, n=330), continuando a representar a maioria da população. Assim, o efeito de imunidade de grupo observado foi apenas devido à vacina PCV7 porque não houve alterações entre os dois períodos da prevalência do conjunto de todos os serotipos incluídos na PPV23 e até houve dois incluídos nesta vacina, 7F e 19A, que aumentaram a sua frequência.

Os serotipos incluídos na PPV23 não deveriam ter representado a maioria da população porque esta vacina deveria ter prevenido as infecções invasivas por estes serotipos, isto se a vacina tivesse sido administrada à maioria dos idosos e se for realmente eficaz, o que actualmente ainda é um tema de discussão. Apesar de não ter sido recolhida a informação do estado vacinal dos doentes de onde foram retiradas as amostras, houve um estudo num centro de saúde na zona norte de Portugal que verificou que a PPV23 foi prescrita pelos médicos de família a menos de 9% dos idosos entre 2003 e 2008⁷². No sul de Barcelona também só 20,1% dos idosos estavam vacinados com esta vacina em 2005-2007⁶. Assim, a PPV23 não teve um efeito na prevalência dos serotipos porque o número de indivíduos vacinados foi, provavelmente, insuficiente, continuando os serotipos desta vacina a representar a maioria da população.

Quanto à distribuição dos serotipos, neste trabalho houve cinco (3, 7F, 19A, 14 e 1) que se destacaram e representaram mais de metade da população (55%). Estes cinco serotipos também foram os mais prevalentes na população pneumocócica de infecções invasivas em crianças e adolescentes com menos de 18 anos² em Portugal, havendo apenas diferenças nas suas prevalências. Assim, no período 2006-2008, o serotipo 1 foi o mais prevalente nas crianças e o serotipo 3 foi apenas o quinto mais encontrado, enquanto nos idosos verifica-se o contrário. No entanto, a população pneumocócica invasiva nos idosos é mais diversa do que a população encontrada nas crianças, uma vez que o SID obtido neste trabalho (SID=0,929; I.C. 95%: 0,918-0,939) é maior que o SID observado nas crianças (SID=0,886; I.C. 95%: 0,863-0,908)². Na região da Catalunha⁵⁵, em Espanha, durante o ano de 2009 também se verificou que os cinco serotipos mais prevalentes nas infecções invasivas em idosos (≥ 65 anos) foram os mesmos que os observados neste trabalho. Tal como em Portugal, o serotipo 3 foi o mais prevalente e o serotipo 1 foi o quinto, enquanto os serotipos 19A, 14 e 7F apresentaram ordens diferentes. Quanto à colonização, não é possível fazer uma comparação directa com a infecção invasiva em idosos porque ainda não foram publicados estudos de colonização neste grupo etário em Portugal. A prevalência dos serotipos na colonização⁵⁸ em crianças é diferente em relação à infecção invasiva^{2,3} neste grupo etário em Portugal, portanto, nos idosos esta situação também poderá ser semelhante.

Em Portugal, o serotipo 14, que está incluído na PCV7, continua a estar entre os serotipos mais prevalentes nos idosos, mas nos EUA⁵⁹ e em Inglaterra⁵³ este serotipo teve uma prevalência baixa, tendo ocorrido uma diminuição significativa no período após a introdução da PCV7. Nestes dois países a PCV7 tem uma cobertura vacinal muito elevada, pois 93% das crianças nascidas em 2006 nos EUA foram vacinadas⁵⁹ e em Inglaterra esta vacina está incluída no plano nacional de vacinação³³. Em Portugal verificou-se que só 57,4% das crianças que frequentam infantários na área de Lisboa estavam vacinadas com pelo menos uma dose da PCV7 em 2006⁶⁴. Assim, a cobertura vacinal da PCV7 em Portugal não é universal e pode ter sido insuficiente para prevenir eficazmente a transmissão do serotipo 14 aos idosos, não se notando uma diminuição neste grupo etário como a que ocorreu em Inglaterra e EUA. Tal como em Portugal, o serotipo 14 também esteve entre os mais prevalentes nas infecções invasivas em idosos em Espanha e a cobertura da PCV7 também não é universal, tendo sido reportado que 60,3% e 77,7% das crianças com menos de 2 anos e entre 2-4 anos, respectivamente, estavam vacinadas com a PCV7⁵⁵.

4.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos

A frequência das estirpes resistentes aos antimicrobianos nos períodos pré-vacinal e 2008-2009 foram comparadas pelo teste exacto de Fisher para identificar se ocorreram alterações entre os dois períodos. Verifica-se que a proporção de estirpes resistentes em cada serotipo não se alterou de um período para o outro. No período pré-vacinal não foi encontrada nenhuma estirpe resistente à

amoxicilina, mas em 2008-2009 emergiram estirpes não susceptíveis a este antimicrobiano, o que foi significativo ($p=0,0188$). A resistência à cefotaxima também aumentou significativamente de 1,0% ($n=2$) para 4,8% ($n=19$) entre os dois períodos ($p=0,0172$). Apesar de não ter sido estatisticamente significativo, a não susceptibilidade à penicilina aumentou de 15,6% ($n=32$) para 20,1% ($n=80$). Assim, nesta população pneumocócica houve um aumento geral da resistência aos β -lactâmicos entre os dois períodos.

A resistência à eritromicina também teve um aumento significativo entre os dois períodos de 14,1% para 21,1% ($p=0,0470$), mas a resistência à clindamicina não se alterou significativamente. Quanto aos fenótipos de resistência aos macrólidos, não houve alteração significativa na proporção de estirpes do fenotipo MLS_B entre os dois períodos, mas a proporção do fenotipo M aumentou de 2,4% para 6,3% ($p=0,0471$), o que explica que só o aumento da resistência à eritromicina e não à clindamicina tenha sido detectado entre os dois períodos. Em 1999-2003 as estirpes com o fenotipo M eram todas do serotipo 14, mas em 2008-2009 foram encontradas estirpes com este fenotipo em sete serotipos além do 14, havendo, portanto, uma contribuição destes serotipos para o aumento do fenotipo M. Em Espanha, o aumento deste fenotipo foi associado ao clone Espanha^{9V}-ST156⁷ que apresenta os serotipos 9V e 14. Neste estudo foram encontradas estirpes do fenotipo M tanto no clone Espanha^{9V}-ST156 como no clone Inglaterra¹⁴-ST9, não tendo havido um aumento significativo da proporção de estirpes deste fenotipo dentro do serotipo 14 entre 1999-2003 e 2008-2009.

A proporção de estirpes simultaneamente resistentes à penicilina e eritromicina aumentou de 5,4% para 13,0% entre o período pré-vacinal e 2008-2009, o que é preocupante, pois estes antibióticos são importantes no tratamento das infecções pneumocócicas. O consumo de antibióticos em Portugal é um dos mais elevados na Europa, principalmente de β -lactâmicos e de macrólidos³, exactamente aqueles em que se verificaram aumentos da frequência de estirpes resistentes entre o período pré-vacinal e 2008-2009. Foi comprovado que o aumento do consumo de antibióticos está directamente correlacionado com o aumento da resistência³⁴, assim, o uso excessivo de antimicrobianos pode ter exercido uma força selectiva na população bacteriana que permitiu a expansão de estirpes resistentes a estas duas classes de antimicrobianos.

Quanto aos outros antibióticos, não houve alterações significativas entre os dois períodos. A resistência à levofloxacina e à telitromicina foi baixa nesta população, enquanto continuaram a não ser encontradas estirpes resistentes à vancomicina e ao linezolid. Em 1999-2003 haviam 63 estirpes (30,7%) resistentes a pelo menos um antibiótico e 24 (11,7%) multi-resistentes. No entanto, estas duas proporções também não se alteraram significativamente em 2008-2009 (36,1% e 17,0%, respectivamente). Assim, entre os dois períodos verifica-se que houve um aumento da resistência aos β -lactâmicos e macrólidos e uma manutenção da resistência aos outros antimicrobianos, apesar de ter havido uma diminuição significativa dentro das estirpes resistentes da representação dos serotipos

incluídos na PCV7 de 63,5% (n=40) em 1999-2003 para 41,7% (n=60) em 2008-2009 ($p=0,0042$). A PCV7 inclui cinco serotipos (6B, 9V, 14, 19F e 23F) associados à resistência a antimicrobianos² e, como estes diminuíram, a frequência de estirpes resistentes poderia ter diminuído. Porém, um estudo sobre a colonização em Portugal também verificou que a resistência a antimicrobianos não diminuiu após a introdução da PCV7⁶⁹. Este estudo concluiu que a manutenção da resistência foi devido ao aumento de clones associados com a resistência de serotipos não incluídos na PCV7. Neste trabalho, houve um aumento do serotipo 19A que foi associado à multi-resistência. Além do 19A, outros dois serotipos não incluídos na PCV7, 6C e 15A, também apresentaram associações com a resistência aos antibióticos. Assim, tal como na colonização, os serotipos não incluídos na PCV7 foram importantes para a manutenção da resistência aos antimicrobianos nas infecções invasivas em idosos.

4.3. Potenciais efeitos das vacinas conjugadas e da implementação da PCV13 na vacinação de adultos

Os maiores custos das infecções pneumocócicas provêm do grupo etário ≥ 65 anos e a pneumonia é a infecção pneumocócica que apresenta os custos mais elevados⁴². Assim, a prevenção eficaz deste tipo de infecções é necessária para reduzir o impacto na saúde dos idosos e também na economia. Actualmente, a vacinação com a PPV23 é recomendada para este grupo etário mas, como já foi discutido na secção 4.1, esta estratégia não está a ter efeitos na prevalência dos serotipos porque a proporção de indivíduos vacinados é, provavelmente, muito baixa. É esperado que a recente introdução da PCV10 e da PCV13 na vacinação pediátrica exerça o mesmo efeito de imunidade de grupo que foi observado com a utilização da PCV7. No entanto, os serotipos incluídos na PCV7 só representavam cerca de 30% da população responsável por infecções invasivas nos idosos no período pré-vacinal e os benefícios indirectos observados podem não ter sido suficientes para se notar um efeito significativo na redução da incidência das infecções invasivas nos idosos. Assim, como os serotipos incluídos nas vacinas PCV10 e PCV13 representaram 40,4% e 67,9%, respectivamente, da população em 2008-2009, espera-se que haja um efeito de imunidade de grupo maior, principalmente devido à PCV13. A magnitude deste efeito dependerá da eficácia das novas vacinas conjugadas em prevenir a colonização das crianças pelos serotipos que foram adicionados às suas formulações, diminuindo assim a sua transmissão aos idosos.

A implementação em Portugal da PCV13 na vacinação dos idosos é recomendável pois esta vacina apresenta uma cobertura potencialmente elevada das infecções pneumocócicas. Porém, esta cobertura poderá ter diminuído antes da introdução desta vacina nos adultos devido ao possível efeito de imunidade de grupo exercido pela vacinação pediátrica, uma vez que as crianças começaram a ser vacinadas com a PCV13 em 2010. No entanto, observando o efeito da PCV7 nos idosos, a prevalência do serotipo 14 não se alterou significativamente após a introdução desta vacina e este serotipo ainda

foi dos mais prevalentes nas infecções em idosos. Como já foi discutido na secção 4.1, o efeito de imunidade de grupo para este serotipo poderá ter sido menor porque não houve uma vacinação universal das crianças. Assim, como a PCV13 não está incluída no Plano Nacional de Vacinação, a frequência dos serotipos mais prevalentes nos idosos (1, 3, 7F, 14 e 19A) poderá não ter diminuído significativamente. Deste modo, a vacinação directa com a PCV13 poderá ter um efeito benéfico significativamente superior à sua utilização exclusivamente em crianças.

Quanto ao efeito das vacinas conjugadas na resistência aos antimicrobianos, a PCV13 apresentou uma cobertura dos serotipos das estirpes resistentes a pelo menos um antibiótico muito superior à da PCV10 (77,1% contra 47,9%). Assim, poderá ocorrer uma diminuição da frequência de estirpes resistentes devido à introdução da PCV13. Porém, a expansão de serotipos não incluídos na PCV13 e associados à resistência aos antimicrobianos, como o 6C e 15A, poderá atenuar ou mesmo anular a diminuição de resistência esperada. Assim, é necessário um uso adequado dos antimicrobianos para evitar que os efeitos das novas vacinas conjugadas se degradem rapidamente⁵⁵.

Com a implementação da PCV13 na vacinação dos idosos, a utilização da PPV23 deverá ser avaliada. Só deverá continuar se for comprovado que há mais benefícios ao ser administrada em conjunto com a PCV13. De qualquer modo, a sociedade deverá ser alertada para a importância da vacinação anti-pneumocócica, tanto em crianças como em adultos, através de campanhas de sensibilização para atingir uma cobertura vacinal suficiente para haver uma maior protecção contra as infecções pneumocócicas invasivas.

4.4. Composição clonal

Os cinco serotipos mais prevalentes da população estudada estão todos relacionados com clones PMEN, indicando que a sua disseminação mundial é reconhecida. Assim, nos serotipos 1, 3 e 7F destacaram-se os clones Suécia¹-ST306, Holanda³-ST180 e Holanda^{7F}-ST191, respectivamente. As estirpes do serotipo 14 foram relacionadas com os clones Espanha^{9V}-ST156 e Inglaterra¹⁴-ST9, enquanto o serotipo 19A foi associado a quatro clones PMEN diferentes, dos quais se destacou a relação do ST276 com o clone multi-resistente Dinamarca¹⁴-ST230 pela sua maior frequência. Em Espanha, estes clones também foram os mais prevalentes⁶. Quanto aos EUA, há algumas diferenças não só na prevalência dos serotipos, como já foi discutido na secção 4.1, mas também na composição clonal de alguns, como o 1 e o 19A.

A expansão do serotipo 19A foi descrita tanto na Europa como nos EUA. Porém, os clones que aumentaram a sua frequência não foram os mesmos. Em Portugal¹ e em Espanha⁵¹, o genotipo com maior expansão dentro do 19A foi o ST276, enquanto nos EUA⁹ foi o ST320 que está relacionado com o clone Taiwan^{19F}-ST236. Os genotipos predominantes do serotipo 1 também são diferentes entre a Europa e os EUA (ST306 e ST227, respectivamente)¹³. Assim, devido à variação geográfica, é

importante que haja estudos epidemiológicos em diversas regiões para conhecer quais os clones em circulação. Os serotipos dos clones mais prevalentes neste estudo estão incluídos na PCV13, portanto, espera-se uma alteração da composição clonal da população pneumocócica nos próximos anos. Porém, alguns clones podem escapar à pressão vacinal através da alteração da cápsula por recombinação genética, tal como foi descrito nos EUA após a introdução da PCV7⁹.

Nesta população foram encontrados STs que apresentaram mais do que um serotipo (ver secção 3.5.1), sugerindo que houve um evento de recombinação que alterou a sua cápsula. No caso do ST66, que foi encontrado no serotipo 9N e na estirpe NT, os perfis obtidos por PFGE destas estirpes eram muito semelhantes, indicando que uma estirpe do serotipo 9N poderá ter perdido a capacidade de produzir uma cápsula funcional.

Quanto à análise dos complexos clonais definidos pelo algoritmo goeBURST, é necessário ter atenção porque em alguns complexos, principalmente os maiores, é possível encontrar STs com todos os alelos diferentes, ou seja, não relacionados. O algoritmo goeBURST agrupa estes STs no mesmo complexo clonal porque já são conhecidos vários STs que estabelecem a ligação entre eles. O maior complexo clonal, CC156, engloba dois clones PMEN, Espanha^{9V}-ST156 e Columbia^{23F}-ST338. Estes clones só partilham um alelo e ilustram esta limitação do algoritmo goeBURST.

4.5. Distribuição dos ferotipos

Neste trabalho 72,4% das estirpes eram do ferotipo CSP-1 e 25,8% eram do ferotipo CSP-2, sendo o CSP-1 predominante. Esta proporção é semelhante à observada num estudo efectuado anteriormente em Portugal com estirpes invasivas recolhidas entre 1999 e 2002, em que 70,6% eram do ferotipo CSP-1¹⁷. Quanto à associação dos serotipos com os ferotipos, este trabalho e o estudo anterior associaram os serotipos 1 e 14 ao ferotipo CSP-1 e o 9N ao CSP-2. As principais diferenças entre os dois estudos são a associação do 19A a CSP-2 neste trabalho, enquanto no estudo anterior este serotipo não foi significativamente associado a nenhum ferotipo. Para o serotipo 3 a situação foi inversa, pois no estudo anterior foi associado ao ferotipo CSP-2 e neste trabalho não foi detectada nenhuma associação. Quanto à associação com a resistência aos antibióticos, a única semelhança com o estudo anterior foi a associação do ferotipo CSP-2 com a resistência à tetraciclina. Neste trabalho, o ferotipo CSP-2 também foi associado com a resistência à penicilina, à eritromicina e à clindamicina, mas no estudo anterior a não susceptibilidade à penicilina foi associada com o ferotipo CSP-1. Esta diferença deve-se, provavelmente, à expansão do clone ST276 do serotipo 19A, que apresenta o ferotipo CSP-2 e é resistente à penicilina, uma vez que as populações estudadas pertencem a dois períodos diferentes.

Carrolo e colaboradores¹⁷ verificaram que o ferotipo era uma propriedade clonal, o que foi confirmado neste trabalho. Assim, a distribuição dos ferotipos está directamente relacionada com a

composição clonal da população. As razões para a predominância do ferotipo CSP-1 ainda não são conhecidas, mas pensa-se que este ferotipo poderá conferir alguma vantagem adaptativa em relação ao ferotipo CSP-2, como por exemplo na capacidade de colonização ou de invasão. Sabe-se que a cascata da competência também desencadeia o mecanismo de fratricídio²⁰, o que poderá aumentar a capacidade de colonização das estirpes pela melhoria na formação de biofilmes. A capacidade de invasão pode ser avaliada pela comparação com a distribuição dos ferotipos em colonização. Se a proporção de estirpes CSP-1 e CSP-2 for igual em colonização, então o ferotipo CSP-1 terá uma capacidade de invasão superior.

4.6. Limitações

Este trabalho não inclui todos os casos de infecções invasivas em idosos em Portugal, pois nem todos os laboratórios do país estão incluídos na rede de vigilância do Grupo de Estudo Português de Bactérias Patogénicas Respiratórias. Desta forma, não é possível inferir a incidência destas infecções nos idosos e quantificar os efeitos das vacinas PCV7 e PPV23 na incidência em geral e individualmente por serotipos. A informação vacinal dos doentes de onde foram recolhidas as estirpes também não é conhecida, não permitindo averiguar se houve falhas da PPV23 nesta amostra.

A vacina PCV10 foi introduzida em Março de 2009, ou seja, dentro do período de estudo, e poderá ter influenciado a distribuição dos serotipos. Porém, não se verificaram diferenças de nenhum serotipo de 2008 para 2009, e, como os efeitos da vacina PCV7 só se notaram dois anos depois nos adultos³, a PCV10, provavelmente, não teve um efeito significativo.

Na comparação com o período pré-vacinal não se pode excluir a possível influência do número de estirpes recolhido neste período na distribuição dos serotipos, uma vez que em alguns anos foram recolhidas muito poucas estirpes.

Neste trabalho não foi determinado o ST de todas as estirpes por razões económicas. Assim, houve uma limitação na análise da composição clonal da população e na análise da congruência entre os métodos de tipagem.

4.7. Perspectivas futuras

A monitorização epidemiológica das infecções invasivas continuará a ser importante porque permitirá avaliar as alterações que poderão ocorrer nos idosos devido ao potencial efeito de imunidade de grupo gerado pela utilização das vacinas PCV10 e PCV13 nas crianças. Como este trabalho caracteriza a estrutura da população pneumocócica invasiva em idosos antes da introdução das novas vacinas conjugadas, ele poderá ser utilizado no futuro como base para a análise dos efeitos destas vacinas.

Devido à implementação da PCV13 na vacinação de adultos com ≥ 50 anos, deverá ser feita uma avaliação da vacinação dos idosos, nomeadamente quanto à utilização da PPV23. Neste caso, deverá ser ponderada a continuação da utilização da PPV23, que poderá ser utilizada como reforço da PCV13 de modo a aumentar a protecção contra um maior número de serotipos.

A PPV23 não tem sido a solução para uma prevenção verdadeiramente eficaz das infecções pneumocócicas e as vacinas conjugadas, apesar de serem muito eficazes, têm a grande desvantagem de ocorrer uma substituição dos serotipos responsáveis pelas infecções devido à expansão de serotipos não vacinais ou devido à evasão da pressão vacinal pela mudança da cápsula através de recombinação genética. As vacinas conjugadas são, portanto, uma solução a médio prazo e a solução ideal seria o desenvolvimento de uma vacina cuja protecção fosse independente do serotipo. As vacinas proteicas e as vacinas de células inteiras podem conferir uma protecção universal, estando a eficácia e a segurança destas vacinas a ser investigadas em ratinhos. No entanto, ainda nenhuma passou a primeira fase dos ensaios clínicos⁵⁰ e estima-se que não estarão disponíveis antes de 2016-2020⁷⁴. Assim, as vacinas conjugadas continuarão como a principal forma de prevenção destas infecções nos próximos anos.

Um estudo de colonização em idosos em Portugal seria útil para comparar com a epidemiologia da população de infecção invasiva. A determinação da distribuição dos ferotipos na população em colonização também poderia ajudar a compreender a predominância do ferotipo CSP-1 que foi observada nas infecções invasivas. Para facilitar o estudo, a recolha de amostras poderia ser realizada em indivíduos hospitalizados ou a viver em lares, mas, neste caso, seria necessário considerar na análise que nem todos os indivíduos da comunidade estariam a ser representados.

As diferenças entre os dois ferotipos poderiam ser avaliadas. A interacção do ComD de cada ferotipo com o respectivo CSP poderia ser estudada para determinar se é responsável por alguma diferença entre os ferotipos. O papel dos ferotipos na formação de biofilmes também poderia ser estudado, pois o desencadeamento da cascata da competência induz o mecanismo de fratricídio que está relacionado com a formação deste tipo de estruturas biológicas.

Capítulo 5 – Conclusões

Neste trabalho verificou-se que os serotipos mais prevalentes em 2008-2009 foram o 3 (14,5%), o 7F (12,8%), o 19A (12,0%), o 14 (10,0%) e o 1 (5,8%) e os principais clones em circulação foram Holanda³-ST180, Holanda^{7F}-ST191, Dinamarca¹⁴-ST230, Espanha^{9V}-ST156, Inglaterra¹⁴-ST9 e Suécia¹-ST306.

Também se observou que continuou a ocorrer um efeito de imunidade de grupo nos idosos devido à utilização da PCV7 na vacinação pediátrica, pois a representação dos serotipos incluídos nesta vacina diminuiu de 29,8% no período pré-vacinal para 19,5% em 2008-2009.

Em relação aos serotipos incluídos na PPV23, verificou-se que representaram a maior parte da população (82,7%), não se detectando nenhuma alteração da sua representação entre o período pré-vacinal e o período 2008-2009 porque o número de indivíduos vacinados foi, provavelmente, muito baixo.

Quanto à resistência aos antimicrobianos, observou-se que era relativamente elevada, principalmente aos β -lactâmicos e aos macrólidos, tendo-se verificado um aumento em relação ao período pré-vacinal. Quanto aos outros antimicrobianos, não houve alteração da frequência de estirpes resistentes. Os serotipos 14 e 19A foram os que tiveram a maior contribuição para a resistência aos antimicrobianos nesta população. No entanto, houve outros serotipos que também estiveram associados à resistência aos antibióticos, como os serotipos 6C e 15A, e que não estão incluídos em nenhuma formulação das actuais vacinas conjugadas.

Se a vacina PCV13 tiver a mesma eficácia nos adultos que a PCV7 teve nas crianças, então a sua implementação na vacinação dos idosos poderá ter um impacto benéfico importante, uma vez que os serotipos desta vacina representaram 67,9% da amostra. Porém, há sempre a desvantagem da potencial substituição por serotipos não incluídos na vacina. A PCV13 também poderá alterar a composição clonal da população pneumocócica de idosos, pois os clones mais prevalentes estão incluídos na formulação desta vacina.

Quanto aos ferotipos, verificou-se que o CSP-1 foi o ferotipo predominante na amostra estudada. Também se concluiu que esta característica é uma propriedade clonal, tal como foi demonstrado anteriormente durante o período pré-vacinal.

As vacinas actuais são uma solução a médio prazo, pois não protegem contra todas as infecções pneumocócicas. Assim, são necessárias novas vacinas que forneçam uma protecção independente do serotipo.

Bibliografia

1. **Aguiar, S.I., F.R. Pinto, S. Nunes, I. Serrano, J. Melo-Cristino, R. Sá-Leão, M. Ramirez, and H. de Lencastre.** 2010. Denmark14-230 clone as an increasing cause of pneumococcal infection in Portugal within a background of diverse serotype 19A lineages. *J Clin Microbiol*, 48, 101-8.
2. **Aguiar, S.I., M.J. Brito, J. Gonçalo-Marques, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez.** 2010. Serotypes 1, 7F and 19A became the leading causes of pediatric invasive pneumococcal infections in Portugal after 7 years of heptavalent conjugate vaccine use. *Vaccine*, 28, 5167-73.
3. **Aguiar, S.I., I. Serrano, F.R. Pinto, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez.** 2008. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive disease with non-universal vaccination coverage of the seven-valent conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect*, 14, 835-43.
4. **Aguiar, S.I., M.J. Frias, L. Santos, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez.** 2006. Emergence of optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Portugal. *Microb Drug Resist*, 12, 239-45.
5. **Appelbaum, P.C.** 2002. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. *Clin Infect Dis*, 34, 1613-20.
6. **Ardanuy, C., F. Tubau, R. Pallares, L. Calatayud, M.A. Domínguez, D. Rolo, I. Grau, R. Martín, and J. Liñares.** 2009. Epidemiology of invasive pneumococcal disease among adult patients in barcelona before and after pediatric 7-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction, 1997-2007. *Clin Infect Dis*, 48, 57-64.
7. **Ardanuy, C., A. Fenoll, S. Berron, L. Calatayud, and J. Linares.** 2006. Increase of the M phenotype among erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Spain related to the serotype 14 variant of the Spain^{9v}-3 clone. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 3162-5.
8. **Bauer, A.W., W.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45, 493-6.
9. **Beall, B.W., R.E. Gertz, R.L. Hukower, C.G. Whitney, M.R. Moore, and A.B. Brueggemann.** 2011. Shifting genetic structure of invasive serotype 19A pneumococci in the United States. *J Infect Dis*, 203, 1360-8.
10. **Benjamini, Y., and Y. Hochberg.** 1995. Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*, 57, 289-300.
11. **Bogaert, D., R. De Groot, and P.W. Hermans.** 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*, 4, 144-54.
12. **Brueggemann, A.B., R. Pai, D.W. Crook, and B. Beall.** 2007. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog*, 3, e168.
13. **Brueggemann, A.B., and B.G. Spratt.** 2003. Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. *J Clin Microbiol*, 41, 4966-70.
14. **Carriço, J.A., C. Silva-Costa, J. Melo-Cristino, F.R. Pinto, H. de Lencastre, J.S. Almeida, and M. Ramirez.** 2006. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol*, 44, 2524-32.
15. **Carriço, J.A., F.R. Pinto, C. Simas, S. Nunes, N.G. Sousa, N. Frazão, H. de Lencastre, and J.S. Almeida.** 2005. Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 43, 5483-90.

16. **Carrolo, M., M.J. Frias, F.R. Pinto, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez.** 2010. Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS One, 5, e15678.
17. **Carrolo, M., F.R. Pinto, J. Melo-Cristino, and M. Ramirez.** 2009. Pherotypes are driving genetic differentiation within *Streptococcus pneumoniae*. BMC Microbiol, 9, 191.
18. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2010. Updated recommendations for prevention of invasive pneumococcal disease among adults using the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23). MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 59, 1102-6.
19. **Chalkley, L., C. Schuster, E. Potgieter, and R. Hakenbeck.** 1991. Relatedness between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci: transfer of penicillin resistance determinants and immunological similarities of penicillin-binding proteins. FEMS Microbiol Lett, 69, 35-42.
20. **Claverys, J.P., and L.S. Havarstein.** 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'etre. Nat Rev Microbiol, 5, 219-29.
21. **Claverys, J.P., and L.S. Havarstein.** 2002. Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Front Biosci, 7, d1798-814.
22. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S21, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
23. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - eight edition. CLSI document M07-A8, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
24. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
25. **Croucher, N.J., S.R. Harris, C. Fraser, M.A. Quail, J. Burton, M. van der Linden, L. McGee, A. von Gottberg, J.H. Song, K.S. Ko, et al.** 2011. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. Science, 331, 430-4.
26. **Dagan, R.** 2009. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Microbiol Infect, 15 Suppl 3, 16-20.
27. **Dagan, R.** 2009. Serotype replacement in perspective. Vaccine, 27 Suppl 3, C22-4.
28. **Dowell, S.F., C.G. Whitney, C. Wright, C.E. Rose, Jr., and A. Schuchat.** 2003. Seasonal patterns of invasive pneumococcal disease. Emerg Infect Dis, 9, 573-9.
29. **Enright, M.C., and B.G. Spratt.** 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. Microbiology, 144 (Pt 11), 3049-60.
30. **Feil, E.J., B.C. Li, D.M. Aanensen, W.P. Hanage, and B.G. Spratt.** 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol, 186, 1518-30.
31. **Francisco, A.P., M. Bugalho, M. Ramirez, and J.A. Carriço.** 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. BMC Bioinformatics, 10, 152.
32. **Gil-Prieto, R., L. García-García, A. Álvaro-Meca, C. Méndez, A. García, and A.G. de Miguel.** 2011. The burden of hospitalisations for community-acquired pneumonia (CAP) and pneumococcal pneumonia in adults in Spain (2003-2007). Vaccine, 29, 412-6.

33. **Gladstone, R.A., J.M. Jefferies, S.N. Faust, and S.C. Clarke.** 2011. Continued control of pneumococcal disease in the UK - the impact of vaccination. *J Med Microbiol*, 60, 1-8.
34. **Goossens, H., M. Ferech, R. Vander Stichele, and M. Elseviers.** 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*, 365, 579-87.
35. **Hak, E., D.E. Grobbee, E.A. Sanders, T.J. Verheij, M. Bolkenbaas, S.M. Huijts, W.C. Gruber, S. Tansey, A. McDonough, B. Thoma, et al.** 2008. Rationale and design of CAPITA: a RCT of 13-valent conjugated pneumococcal vaccine efficacy among older adults. *Neth J Med*, 66, 378-83.
36. **Hanage, W.P., C. Fraser, J. Tang, T.R. Connor, and J. Corander.** 2009. Hyper-recombination, diversity, and antibiotic resistance in pneumococcus. *Science*, 324, 1454-7.
37. **Harboe, Z.B., T.L. Benfield, P. Valentiner-Branth, T. Hjuler, L. Lambertsen, M. Kaltoft, K. Krogfelt, H.C. Slotved, J.J. Christensen, and H.B. Konradsen.** 2010. Temporal trends in invasive pneumococcal disease and pneumococcal serotypes over 7 decades. *Clin Infect Dis*, 50, 329-37.
38. **Hausdorff, W.P.** 2002. Invasive pneumococcal disease in children: geographic and temporal variations in incidence and serotype distribution. *Eur J Pediatr*, 161 Suppl 2, S135-9.
39. **Havarstein, L.S., R. Hakenbeck, and P. Gaustad.** 1997. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol*, 179, 6589-94.
40. **Havarstein, L.S., G. Coomaraswamy, and D.A. Morrison.** 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 11140-4.
41. **Hoskins, J., W.E. Alborn, Jr., J. Arnold, L.C. Blaszcak, S. Burgett, B.S. DeHoff, S.T. Estrem, L. Fritz, D.J. Fu, W. Fuller, et al.** 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol*, 183, 5709-17.
42. **Huang, S.S., K.M. Johnson, G.T. Ray, P. Wroe, T.A. Lieu, M.R. Moore, E.R. Zell, J.A. Linder, C.G. Grijalva, J.P. Metlay, et al.** 2011. Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. *Vaccine*, 29, 3398-412.
43. **Huss, A., P. Scott, A.E. Stuck, C. Trotter, and M. Egger.** 2009. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis. *CMAJ*, 180, 48-58.
44. **Johnsborg, O., V. Eldholm, M.L. Bjornstad, and L.S. Havarstein.** 2008. A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Mol Microbiol*, 69, 245-53.
45. **Johnsborg, O., V. Eldholm, and L.S. Havarstein.** 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol*, 158, 767-78.
46. **Kadioglu, A., J.N. Weiser, J.C. Paton, and P.W. Andrew.** 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*, 6, 288-301.
47. **Kilian, M., K. Poulsen, T. Blomqvist, L.S. Havarstein, M. Bek-Thomsen, H. Tettelin, and U.B. Sorensen.** 2008. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One*, 3, e2683.
48. **Klugman, K.P.** 2001. Efficacy of pneumococcal conjugate vaccines and their effect on carriage and antimicrobial resistance. *Lancet Infect Dis*, 1, 85-91.
49. **Luo, P., and D.A. Morrison.** 2003. Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 185, 349-58.

50. **Malley, R.** 2010. Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. *J Mol Med (Berl)*, 88, 135-42.
51. **Marimón, J.M., M. Alonso, D. Rolo, C. Ardanuy, J. Liñares, and E. Pérez-Trallero.** 2011. Molecular characterization of *Streptococcus pneumoniae* invasive serotype 19A isolates from adults in two Spanish regions (1994-2009). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, [Epub ahead of print].
52. **Melo-Cristino, J., M. Ramirez, N. Serrano, and T. Hanscheid.** 2003. Macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in Portugal: results of a 3-year (1999-2001) multicenter surveillance study. *Microb Drug Resist*, 9, 73-80.
53. **Miller, E., N.J. Andrews, P.A. Waight, M.P. Slack, and R.C. George.** 2011. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*, 11, 760-8.
54. **Moberley, S.A., J. Holden, D.P. Tatham, and R.M. Andrews.** 2008. Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000422.
55. **Muñoz-Almagro, C., P. Ciruela, C. Esteva, F. Marco, M. Navarro, R. Bartolome, G. Sauca, C. Gallés, M. Morta, F. Ballester, et al.** 2011. Serotypes and clones causing invasive pneumococcal disease before the use of new conjugate vaccines in Catalonia, Spain. *J Infect*, 63, 151-62.
56. **Muñoz-Elías, E.J., J. Marcano, and A. Camilli.** 2008. Isolation of *Streptococcus pneumoniae* biofilm mutants and their characterization during nasopharyngeal colonization. *Infect Immun*, 76, 5049-61.
57. **Nuorti, J.P., and C.G. Whitney.** 2010. Prevention of pneumococcal disease among infants and children - use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine - recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*, 59, 1-18.
58. **Nurkka, A., H. Ahman, M. Yaich, J. Eskola, and H. Kayhty.** 2001. Serum and salivary anti-capsular antibodies in infants and children vaccinated with octavalent pneumococcal conjugate vaccines, PncD and PncT. *Vaccine*, 20, 194-201.
59. **Pilishvili, T., C. Lexau, M.M. Farley, J. Hadler, L.H. Harrison, N.M. Bennett, A. Reingold, A. Thomas, W. Schaffner, A.S. Craig, et al.** 2010. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis*, 201, 32-41.
60. **Pinto, F.R., J. Melo-Cristino, and M. Ramirez.** 2008. A confidence interval for the wallace coefficient of concordance and its application to microbial typing methods. *PLoS One*, 3, e3696.
61. **Pozzi, G., L. Masala, F. Iannelli, R. Manganelli, L.S. Havarstein, L. Piccoli, D. Simon, and D.A. Morrison.** 1996. Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone. *J Bacteriol*, 178, 6087-90.
62. **Ramirez, M., D.A. Morrison, and A. Tomasz.** 1997. Ubiquitous distribution of the competence related genes comA and comC among isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist*, 3, 39-52.
63. **Sá-Leão, R., F. Pinto, S. Aguiar, S. Nunes, J.A. Carriço, N. Frazão, N. Gonçalves-Sousa, J. Melo-Cristino, H. de Lencastre, and M. Ramirez.** 2011. Analysis of invasiveness of pneumococcal serotypes and clones circulating in Portugal before widespread use of conjugate vaccines reveals heterogeneous behavior of clones expressing the same serotype. *J Clin Microbiol*, 49, 1369-75.

64. **Sá-Leão, R., S. Nunes, A. Brito-Avão, N. Frazão, A.S. Simões, M.I. Crisóstomo, A.C. Paulo, J. Saldanha, I. Santos-Sanches, and H. de Lencastre.** 2009. Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect*, 15, 1002-7.
65. **Sahyoun, N.R., H. Lentzner, D. Hoyert, and K.N. Robinson.** 2001. Trends in causes of death among the elderly. *Aging Trends*, 1-10.
66. **Scott, D.A., S.F. Komjathy, B.T. Hu, S. Baker, L.A. Supan, C.A. Monahan, W. Gruber, G.R. Siber, and S.P. Lockhart.** 2007. Phase 1 trial of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine*, 25, 6164-6.
67. **Serrano, I., M. Ramirez, and J. Melo-Cristino.** 2004. Invasive *Streptococcus pneumoniae* from Portugal: implications for vaccination and antimicrobial therapy. *Clin Microbiol Infect*, 10, 652-6.
68. **Severiano, A., J.A. Carriço, D.A. Robinson, M. Ramirez, and F.R. Pinto.** 2011. Evaluation of jackknife and bootstrap for defining confidence intervals for pairwise agreement measures. *PLoS One*, 6, e19539.
69. **Simões, A.S., L. Pereira, S. Nunes, A. Brito-Avão, H. de Lencastre, and R. Sá-Leão.** 2011. Clonal evolution leading to maintenance of antibiotic resistance rates among colonizing *Pneumococci* in the PCV7 era in Portugal. *J Clin Microbiol*, 49, 2810-7.
70. **Soares, S., K.G. Kristinsson, J.M. Musser, and A. Tomasz.** 1993. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J Infect Dis*, 168, 158-63.
71. **Sorensen, U.B.** 1993. Typing of pneumococci by using 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol*, 31, 2097-100.
72. **Sousa, M., L.F. Cavadas, R.B. Santos, and A. Macedo.** 2009. Quality evaluation of the prescription of the anti-pneumococcal vaccine in the elderly. *Rev Port Clin Geral*, 25, 531-6.
73. **van der Poll, T., and S.M. Opal.** 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 374, 1543-56.
74. **Vila-Córcoles, A.** 2009. Vaccinate your child and save its grandparents from a heart attack? Current perspectives in antipneumococcal vaccination. *J Intern Med*, 266, 432-44.
75. **World Health Organization (WHO).** 2008. 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*, 83, 373-84.